

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1924-1925. — N° 1

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'ANESTHÉSIE GÉNÉRALE

*Variations de l'adrénaline, de la cholestérine
et des "Lécithines" dans les organes et dans
le sang du cobaye sous l'influence des
anesthésiques généraux.*

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 8 Juillet 1925

POUR OBTENIR LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN

PAR

PIERRE MANCEAU

Pharmacien major de l'Armée. — Chimiste du Service de Santé militaire

Ex-interne des Hôpitaux et Asiles de la Seine

Né à Avallon (Yonne) le 9 Février 1888



LYON

IMPRIMERIE - EXPRESS

46, Rue de la Charité, 46

—
1925

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'ANESTHÉSIE GÉNÉRALE

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire.....	MM. HUGOUNENQ.
Doyen	J. LEPINE.
Assesseur	ROQUE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, FLORENCE (A.), TEISSIER.

PROFESSEURS

Cliniques médicales.....	MM. BARD.
Cliniques chirurgicales.....	ROQUE.
Clinique obstétricale et accouchements.....	TIXIER.
Clinique ophtalmologique.....	BERARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	COMMANDEUR.
Clinique neurologique et psychiatrique.....	ROLLET.
Clinique des maladies des enfants.....	NICOLAS.
Clinique des maladies des femmes.....	LEPINE (J.).
Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....	MOURIQUAND.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	VILLARD.
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie.....	LANNOIS.
Physique biologique, radiologie et physiothérapie.....	ROCHET.
Chimie biologique et médicale.....	NOVE-JOSSERAND.
Chimie organique et toxicologie.....	CLUZET.
Matière médicale et botanique.....	HUGOUNENQ.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....	MOREL.
Anatomie	BRETIN.
Histologie.....	GUIART.
Physiologie	LATARJET.
Pathologie interne.....	POLICARD.
Pathologie et thérapeutiques générales.....	DOYON.
Anatomie pathologique.....	COLLET.
Chirurgie opératoire.....	X.
Médecine expérimentale et comparée, et bactériologie.....	PAVIOU.
Médecine légale.....	PATEL.
Hygiène	ARLOING (F.).
Thérapeutique, hydrologie et climatologie.....	Etienne MARTIN.
Pharmacologie	COURMONT (P.).
	PIC.
	X.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe.....	MM. VALLAS.
— — — Propédeutique de gynécologie.....	CONDAMIN.
— — — Chimie minérale.....	BARRAL.
— — — Urologie	GAYET.

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Orthopédie	LAROYENNE.
Puériculture et hygiène de la première enfance.....	CHATIN.
Stomatologie	TELLIER.

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER.	COTTE.	CORDIER (V.).	MAZEL.
THEVENOT (Léon).	DUROUX.	ROUBIER.	SANTY.
GARIN.	TRILLAT.	FAVRE.	DUNET.
SAVY.	SARVONAT.	BONNET.	CHALIER (André).
FROMENT.	FLORENCE (G.).	RHENTER.	CHALIER (Joseph).
THEVENOT (Lucien).	ROCHAIX.	LEULIER.	NOEL.
PIERY.			CORDIER (Pierre).

M. BAYLE, secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. HUGOUNENQ. *Président*; M. MOREL, *Assesseur*;
MM. SARVONAT et LEULIER, *Agrégés*.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1924-1925. — N° 1

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'ANESTHÉSIE GÉNÉRALE

*Variations de l'adrénaline, de la cholestérine
et des "Lécithines" dans les organes et dans
le sang du cobaye sous l'influence des
anesthésiques généraux.*



THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 8 Juillet 1925

POUR OBTENIR LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN

PAR

PIERRE MANCEAU

*Pharmacien major de l'Armée. — Chimiste du Service de Santé militaire
Ex-interne des Hôpitaux et Asiles de la Seine*

Né à Avallon (Yonne), le 9 Février 1888



LYON

IMPRIMERIE - EXPRESS

46, Rue de la Charité, 46

—
1925

A MA MÈRE

Témoignage d'affection infinie et
faible remerciement pour toute une
vie de sacrifice.

A MON FRÈRE

LE PHARMACIEN-MAJOR EMILE MANCEAU

Témoignage de bien chère affection.

A MES MAÎTRES LYONNAIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR HUGOUNENQ

Professeur de Chimie médicale
Commandeur de la Légion d'honneur
Doyen honoraire de la Faculté de Médecine

Hommage respectueux et reconnaissant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREL

Professeur de Chimie organique
Chevalier de la Légion d'honneur

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BRETIN

Professeur de Botanique et de Matière médicale

Témoignage d'affection respectueuse
et reconnaissante.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BARRAL

Chevalier de la Légion d'honneur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ LEULIER

Chevalier de la Légion d'honneur

Témoignage d'amitié respectueuse et
dévouée.

A MON MAÎTRE MILITAIRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE BRETEAU

Professeur au Val-de-Grâce

Témoignage de respectueux attachement.

INTRODUCTION

Pendant tout le XIX^e siècle, les biologistes, PFLUGER (135) en tête, ont cherché surtout, dans l'étude des substances protéiques, à l'intérieur de la cellule ou en dehors d'elle à percer le mystère des phénomènes vitaux. Il semblait que la multiplicité infinie de leurs transformations et leur exquise sensibilité à tous les agents étaient une condition suffisante des réactions physiologiques et pathologiques des organismes.

C'est OVERTON (132) qui le premier, à la fin du XIX^e siècle, a montré le rôle important que pouvaient jouer en biologie ces substances appelées un demi-siècle auparavant *lipôides*, par KLETZINSKI et qui, s'il faut en croire Ivar BANG (7) pourraient bien prendre dans l'avenir le rôle primordial attribué jusqu'ici aux albuminoïdes dans tous les phénomènes vitaux. Est-ce à dire toutefois qu'après avoir, pendant des années, considéré seulement les albuminoïdes, il soit nécessaire de tomber dans l'excès contraire et d'expliquer tout par les lipôides en exagérant leur rôle ? Non. Les lipôides forment avec les protéines des complexes et cette union fait naître indiscutablement des propriétés nouvelles (citons entre autres l'augmentation du pouvoir hémolysant du sérum avec

la proportion des lipoides, la sensibilité à l'action des venins sous l'augmentation des phosphatides, le pouvoir antihémolytique de la cholestérine en excès).

Ces propriétés nouvelles seront fonction de la constitution physico-chimique de ces complexes; que la quantité de l'un des constituants varie et les propriétés du complexe seront modifiées.

Sera-t-il prouvé un jour que toute variation d'équilibre entre les constituants des cellules et des humeurs amène l'apparition de nouvelles propriétés physiologiques ? Il n'est pas téméraire de le supposer.

Mais alors, étudier les lipoides isolément en dehors de leurs complexes, semble vouer les chercheurs à une stérilité relative, car il n'est pas certain de retrouver dans les produits de dissociation les activités spécifiques des constituants. Ce serait, comme dit LINOSIER (104), « vouloir extraire un rouage d'une montre pour étudier en dehors d'elle son rôle propre. Isolé, le rouage n'est qu'un morceau de cuivre inerte, il n'est rien en dehors de la montre et la montre n'est rien sans lui ».

Nous ne sommes pas complètement de cet avis ; les protéines ont été étudiées en dehors de la cellule dans leurs produits de dégradation et les rudes efforts des savants (1) ont été récompensés par d'amples moissons. Il faut d'abord accumuler des faits; un esprit synthétique en tirera plus tard les conclusions. Toutefois comme le dit très justement JAVILLIER (83) (2): « Le chimiste

(1) Parmi lesquels : SCHUTZENBERGER, DRECHSEL (53), KOSSEL, E. FISCHER, HUGOUNENQ (78).

(2) JAVILLIER, *Bulletin de la Société Chimique*, vol. xxxvii, xxxviii, mai 1925, page 589.

biologiste ne saurait se contenter d'isoler des espèces chimiques, d'en pénétrer la constitution ; il doit encore chercher quels sont leur genèse et leur devenir, et quel équilibre doit régner entre eux pour réaliser ce singulier phénomène qu'est la vie. A chercher ainsi, peut-être verra-t-on un jour s'en dévoiler le mystère, comme dans la belle statue de *Barrias*, se dévoile devant la science, le visage harmonieux et serein de la nature. »

Avant d'aborder ce travail, qu'il nous soit permis d'exprimer notre vive gratitude à nos maîtres lyonnais de la Faculté de Médecine et de Pharmacie pour l'hospitalité généreuse que nous avons reçue auprès d'eux.

A M. le professeur HUGOUNEQ, pour les conseils hautement éclairés et l'intérêt qu'il a témoigné à nos recherches et le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de notre thèse.

A M. le professeur MOREL, pour ses précieux conseils.

A M. le professeur BRETIN, pour l'appui inestimable de ses conseils et de sa bonté.

A M. le professeur LEULIER, à qui nous devons l'idée de cette thèse, pour l'amitié loyale qu'il nous a témoignée.

AVANT-PROPOS

En dosant le chloroforme dans les principaux organes et dans le sang, NICLOUX (128) a montré que les organes les plus riches en lipoides fixaient le plus de chloroforme; nous avons pensé à rechercher si, sous l'influence des anesthésiques généraux, en particulier des anesthésiques généraux gazeux, il n'y avait pas variation de la cholestérine et des lécithines dans les organes et nous avons comparé à ce sujet l'action du chloroforme, de l'éther, de l'acétylène, de l'éthylène, du propylène et du protoxyde d'azote.

Voici le plan que nous avons adopté :

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE I	{	I. — <i>Historique des anesthésiques généraux.</i>			
		II. — <i>Influence des groupements chimiques.</i>			
CHAPITRE II	{	I. — <i>Discussion des théories sur la nature de la membrane cellulaire et de la pénétration des anesthésiques.</i>			
		II. — <i>Mode d'action des anesthésiques généraux.</i>			
CHAPITRE III	{	I. — <i>Propriétés générales de la Cholestérine.</i>			
		II. — <i>Propriétés générales des Lécithines.</i>			
CHAPITRE IV	{	<i>Etude des variations de la cholestérine et des Lécithines dans les principaux organes du cobaye et dans le sang, sous l'influence des anesthésiques généraux.</i>	ARTICLE I	{	Technique générale suivie pour l'extraction et le dosage des lécithines dans les tissus et dans le sang.
			ARTICLE I BIS		Critique des méthodes de dosage de l'acide phosphorique dans les lipoides phosphorés.
			ARTICLE II		Technique générale suivie pour le dosage et l'extraction de la cholestérine dans les tissus et dans le sang.
CHAPITRE V	{	<i>Etude des variations de l'adrénaline dans les capsules surrénales du cobaye sous l'influence du chloroforme et du propylène.</i>	ARTICLE I	{	Propriétés générales de l'adrénaline.
			ARTICLE II		Technique générale suivie pour l'extraction et le dosage de l'adrénaline dans les capsules surrénales.
CHAPITRE V RECHERCHES EXPÉRI- MENTALES	{		ARTICLE I. — Application au cobaye normal.		
			ARTICLE II. — Application au cobaye normal, anesthésié par le chloroforme.		
			ARTICLE III. — Application au cobaye normal, anesthésié par l'éther.		
			ARTICLE IV. — Application au cobaye normal, le protoxyde d'azote.		
			ARTICLE V. — Application au cobaye normal, anesthésié par l'acétylène.		
			ARTICLE VI. — Application au cobaye normal, anesthésié par l'éthylène.		
			ARTICLE VII. — Application au cobaye normal, anesthésié par le propylène.		
CHAPITRE VII. — <i>Discussion des résultats obtenus.</i>					
CHAPITRE VIII. — CONCLUSIONS.					
— — BIBLIOGRAPHIE.					

CHAPITRE PREMIER

I. — Historique des Anesthésiques généraux gazeux et volatils non gazeux.

Les narcotiques, comme la mandragore, le pavot, la morelle, la ciguë, la jusquiame, étaient déjà employés au temps d'HIPPOCRATE ainsi que le haschisch pour atténuer les douleurs opératoires chirurgicales.

La compression des vaisseaux du cou était employée dans ce but par ARISTOTE et les Assyriens.

Au xv^e siècle on imprégnait des éponges de sucs narcotiques que l'on faisait respirer.

En 1784, Saxe MOORE préconise la compression des nerfs. J.-D. LARREY, la réfrigération.

En 1789, Humphry DAVY emploie le protoxyde d'azote.

En 1844, Horace WELLS, dentiste à Hartford, pratique une opération sous anesthésie au protoxyde d'azote et découvre les propriétés anesthésiques de l'éther mais il se vit ravir tous les fruits de son invention par son élève, MORTON, qui s'associa au chimiste JACKSON.

Dès 1847, MALGAIGNE et VELPEAU, en France, adoptent

l'éther comme anesthésique. La même année (mars 1847), FLOURENS annonce à l'Académie des Sciences les propriétés anesthésiques du chloroforme découvert par SOUBEYRAN, en 1831; SIMPSON, d'Edimbourg, applique le chloroforme à l'homme et son emploi comme anesthésique se répand en France et en Allemagne.

Paul BERT en fait l'expérimentation méthodique et introduit l'usage des mélanges titrés.

Le chlorure d'éthyle a été essayé par Von HACKER en 1897.

Le bromure et iodure d'éthyle par RABUTEAU.

Le chlorure d'éthylène par RABUTEAU.

Le chlorure d'éthylidène par LANGENBECK.

Le pental (diméthyléthylène) par HOLLANDER, 1891,

Citons encore le chlorure de méthylène $\text{CH}_2 \text{Cl}_2$ (Solesthine de MEISTER Lucius) ; le trichloroéthylène CHCl_3 (chlorylène de KAHLBAUM).

Les anesthésiques gazeux sont redevenus en faveur depuis quelques années et en particulier depuis la guerre, après les observations des chirurgiens de toutes les nationalités. La Conférence Chirurgicale interalliée de novembre 1918 donne dans ses comptes rendus la liste, par ordre de préférence, des anesthésiques que l'on doit employer.

Des différents anesthésiques, le meilleur est celui qui est le moins *hypotensif*. C'est pourquoi le protoxyde d'azote associé à l'oxygène a été recommandé particulièrement dans les cas de shock. Voici les conclusions du rapport :

Conclusions sur l'anesthésie en chirurgie de guerre

« 1° L'anesthésie générale doit être largement employée
« en chirurgie de guerre : elle constitue la méthode de
« choix.

« 2° Les méthodes employées sont, par ordre de pré-
« férence :

« a) Le protoxyde d'azote associé à l'oxygène;

« b) L'éther, et plus spécialement l'éther chauffé;

« c) Le chloréthyle;

« d) Le chloroforme.

« Chacun de ces agents doit être administré aux doses
« les plus réduites.

« Le chloroforme doit être déconseillé.

« 3° Pour les grands blessés et les shockés, les métho-
« des anesthésiques recommandables sont :

« Le protoxyde d'azote associé à l'oxygène;

« Le chloréthyle;

« L'anesthésie locale.

« Dans les armées anglaises et américaines, on utilise
« plus particulièrement l'éther chauffé. »

Ces observations justifient l'étude des autres gaz sus-
ceptibles de provoquer l'anesthésie.

GAUSS et WIELAND (175) ont étudié surtout l'acétylène;
d'après ces auteurs, ce gaz serait un anesthésique rapide,
sans effets secondaires fâcheux sur la circulation et les
poumons.

BROWN et HENDERSON (Toronto) (27), ainsi que
LUCKARDT et CARTER (106) (Chicago) ont fait l'étude
physiologique de l'éthylène reconnu déjà comme anes-
thésique par WIELAND (174). L'anesthésie est rapide, le
réveil aussi; ce gaz a l'énorme avantage de ne pas avoir

d'action hypotensive et n'influence pas le rythme cardiaque.

Si l'on pousse la concentration jusqu'à la mort, celle-ci arrive par arrêt respiratoire.

Il a sur le protoxyde d'azote l'avantage d'agir mélangé préalablement à l'oxygène :

10 % d'oxygène,

90 % d'éthylène,

Un mélange de 80 à 85 % d'éthylène et

un mélange de 20 à 15 % d'oxygène

suffit à entretenir l'anesthésie.

L'éthylène a été étudié chimiquement par PAPIN et AMBARD (133) en France, HORWITZ en Angleterre.

Les conclusions de ces auteurs sont toutes favorables.

Récemment (1922) K. MEYER (118) et HOPFF (118) ont étudié le propylène et ont montré que les concentrations actives de ce gaz (pour la souris) sont les 5/8 de celle de l'éthylène.

Ces auteurs ont montré en outre que le méthane n'est anesthésique qu'à des concentrations bien plus fortes. Ce gaz avait été étudié auparavant en France par REGNAULT et VILLEJEAN (144).

Pour tous ces gaz, il faut tenir compte de la loi de Paul BERT :

« L'action des gaz et des vapeurs sur l'être vivant est réglée par leur tension partielle. »

TIFFENEAU (164 bis), dans son article, donne les concentrations actives de ces divers gaz rangés par ordre d'activité croissante (pour la souris).

Methane	Protoxyde d'Azote	Ethylène	Acétylène	Propylène
370	100	80	65	50

Il faut attirer l'attention sur le fait que tous ces gaz, sauf le protoxyde d'azote, non seulement sont inflammables mais forment avec l'oxygène des mélanges explosifs. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec le propylène. Nous poursuivrons nos recherches sur ce gaz, car l'alcool isopropylique générateur de ce carbure est devenu un produit industriel. Ce gaz pourrait rendre les plus grands services en temps de guerre et remplacer avantageusement le protoxyde d'azote.

II. — Influence des groupements chimiques

Bien que tous les corps à l'état gazeux soient susceptibles de provoquer la narcose, comme nous le verrons plus loin, il existe néanmoins dans chacune des familles de la chimie organique certains groupements fonctionnels ou noyaux privilégiés.

En partant du méthane et en remplaçant successivement les atomes d'hydrogène par du Cl, nous avons la série des corps suivants :



le pouvoir hypnotique va en croissant du chlorure de méthyle au chloroforme.

Le dérivé tétrachloré n'est plus un hypnotique mais un poison tétanisant.

Dans cette famille citons encore le chloral et l'isopral ($\text{CCl}^3\text{-CHOH-CH}^3$). Mais il faut mentionner que si la présence du chlore dans la molécule augmente l'action anesthésique, elle augmente aussi les actions secondaires néfastes sur le cœur et la circulation.

Le brome possède les mêmes propriétés que le chlore, celles de l'iode sont douteuses.

Toute la série des carbures gras, jusqu'au propylène, fournit des anesthésiques. Le pouvoir hypnotique de la molécule croît avec la nature des radicaux (les radicaux éthyliques étant plus actifs que les méthyles) et avec le nombre de ces radicaux. Cette force s'élève également des alcools primaires aux alcools tertiaires. Les restes benzéniques introduits dans d'autres noyaux augmentent aussi l'action anesthésique.

Entre le protoxyde d'azote et le chloroforme il n'existe aucune analogie physique ou chimique. A défaut de lien de parenté chimique, la volatilité paraît être un lien de parenté physique entre les divers anesthésiques généraux.

CHAPITRE II

I. — Discussion des théories sur la nature de la membrane cellulaire et de la pénétration des anesthésiques

A. — Théorie d'Overton

Les lipoides et surtout la cholestérine, les lécithines, le protagon, la cérébrine, etc., ont pour principale fonction de régulariser les propriétés osmotiques des cellules végétales et animales et de leur membrane; c'est ce que les travaux d'OVERTON (1845) (132) et de HANS MEYER (117) tendent à démontrer.

Voici ce que dit OVERTON (132) à ce sujet :

« Les lipoides du cerveau qui sont presque exclusivement formés de phosphatides, constituent une partie intégrante du protoplasma de toutes les cellules végétales et animales, et, au point de vue de la vie cellulaire ne doivent le céder en importance qu'aux protéines. Il est même vraisemblable qu'en ce qui concerne l'état physique du protoplasma, leur rôle est encore plus net que celui des protéines. Les modifications d'ordre physique

qu'éprouvent les lipoides par l'absorption des substances étrangères (quelle que soit la manière dont ces modifications agissent sur les phénomènes vitaux) sont le point de départ commun pour l'action principale de plus de la moitié des combinaisons organiques. »

OVERTON en conclut que l'enveloppe cellulaire ou plutôt la couche externe du protoplasma est constituée par un mélange de cholestérine et de phosphatides. Le succès de cette hypothèse fut si grand que l'on supposa que toutes les parties de la cellule, noyau, vacuoles pouvaient être entourées de cholestérine; OVERTON en déduit la loi suivante :

« La perméabilité de la cellule pour certains corps est liée à la solubilité de ces corps dans les lipoides de cette membrane. »

Cette loi qui fit naître beaucoup d'idées nouvelles au point de vue biologique est basée sur les faits suivants :

1° Le passage d'une substance à travers une membrane dépend de sa solubilité dans cette membrane. *Ex.*: une membrane de caoutchouc supporte d'un côté de l'alcool, de l'autre du sulfure de carbone, chloroforme, toluène, éther; on constate que ces liquides traversent la lame d'autant plus vite qu'ils sont plus ou moins solubles dans le caoutchouc (FLUSIN) (71);

2° Tous les colorants dits « vitaux », c'est-à-dire pouvant pénétrer dans les cellules vivantes, sont solubles dans les lipoides (rouge neutre, soudan III, bleu de toluidine, safranine bleue MI III, etc.), on peut teindre ainsi les tissus vivants des têtards ou des grenouilles ;

3° Il en est de même des corps comme l'urée, la glycérine, l'alcool. Si ce raisonnement est exact, les urées

substituées, plus solubles dans les huiles que l'urée pure, devraient pénétrer plus vite dans la cellule; c'est ce que prouve en effet l'expérience, et OVERTON a montré que le dérivé triméthylé pénètre instantanément tandis que les autres composés moins substitués, dérivés mono et biméthylé, pénétraient lentement.

GRYNS et WARBURG ont fait les mêmes études sur les globules rouges.

B. — Objections à la théorie d'Overton.

R. HÖBER a montré que les produits physiologiquement nécessaires, acides aminés, sucres, sels d'acides organiques, les sels minéraux comme le potassium pénètrent dans la cellule pour y constituer des corps indispensables à la vie. Pourtant ces corps sont insolubles dans les lipoïdes et nous sommes obligés de considérer avec HÖBER :

Une perméabilité passive et continue (substances solubles dans les lipoïdes);

Une perméabilité active et intermittente (pour les substances non solubles dans les lipoïdes) et qui survient au fur et à mesure des besoins sous des influences encore hypothétiques.

FOURNEAU (62) a prouvé récemment (1918) que si la cholestérine rend une membrane de collodion perméable aux hypnotiques, elle enlève à cette membrane toute perméabilité pour l'eau et les sels; il montre toutefois que si les sels ne dialysent pas à travers une membrane de collodion riciné à 20 %, l'addition de lécithine rend le

collodion riciné perméable aux sels même quand la teneur en huile de ricin dépasse 2,5 et atteint 3 %.

THIEULIN (163) en 1920 affirme qu'une membrane contenant une dose suffisante de lipoïde (cholestérine ou lécithine) ne laisse pas diffuser le chlorure de sodium.

RUHLAND, reprenant l'étude des matières colorantes où OVERTON a puisé une partie de ses arguments, fait voir que certaines, insolubles dans les lipoïdes y pénètrent, d'autres solubles n'y pénètrent pas.

Il est vrai qu'OVERTON avait prévu les objections en donnant aux phosphatides de la membrane la propriété de s'imbibier d'eau et de servir ainsi aux échanges aqueux, ce qui semblerait confirmer les expériences de FOURNEAU que nous venons de rapporter.

Pour d'autres auteurs, GÉRARD (65), la membrane est traversée de canalicules.

NATHANSON donne à la membrane une composition en mosaïque (plages alternativement lipoïdiques et protéiques).

Toutes ces objections ont leur valeur; il est plus compréhensible d'admettre l'hypothèse d'une membrane protéolipoïdique dont la constitution se modifierait suivant les besoins du moment.

Les variations d'équilibre ionique du plasma peuvent faire varier les phases des colloïdes (précipitation et dissolution) et transformer ainsi la perméabilité.

Sans assimiler complètement on pourrait comparer la propriété de cette membrane aux modifications de la bordure en brosse de la cellule rénale signalée par REGAUT et POLICARD (143).

Admettons donc en résumé qu'au point de vue physiologique, la théorie d'OVERTON peut encore être discutée.

II. — Mode d'action des anesthésiques généraux

Si au point de vue physiologique la théorie d'OVERTON est discutable, les expériences de ce savant sont capitales au point de vue pharmacodynamique et prouvent le rôle certain joué par les lipoides (cholestérine et lécithines en particulier) dans l'action des anesthésiques, des hypnotiques et des médicaments.

« Toutes les substances chimiques sensiblement indifférentes, ne réagissant ni comme base, ni comme acide, doivent agir sur le protoplasme vivant à condition qu'elles puissent se diffuser. »

BERTHELOT et JUNGLEISCH (13), en 1872, ont établi la loi de partage des substances chimiques en présence de volumes égaux de deux solvants non miscibles, l'huile et l'eau par exemple.

Le partage d'une substance entre ces liquides se fait suivant un rapport dépendant de leur solubilité dans ces substances. Si la quantité de substance dissoute dans l'huile est 2 fois plus forte, le rapport

$$\frac{\text{solubilité dans les lipoides}}{\text{solubilité dans l'eau}} = 2$$

sera ce qu'on appelle le *coefficient de partage*.

Si la théorie d'OVERTON est vraie, un anesthésique dissous dans le milieu aqueux intérieur de l'organisme doit, en pénétrant dans la cellule grâce à sa solubilité dans les lipoides, se partager entre les deux solvants suivant son coefficient de partage et avoir un pouvoir anesthésique d'autant plus grand que son coefficient de partage est plus élevé.

L'expérience a confirmé pleinement cette hypothèse et de nombreux travaux, parmi lesquels brillent ceux de NICLOUX, sont venus jeter un peu de lumière sur le mécanisme d'action des anesthésiques et des hypnotiques en général. Citons encore à ce sujet les travaux de FRANTZ (68), GREHANT (68), MOORE (120) et ROAF (147), ARCHANGELSKI (3), POHL (136), OLIVER (131) et GARRETT, et plus récemment, TIFFENEAU (164 bis), FOURNEAU (62), LILLIE (102), DODGE (51), CLEUDON (39), MORRIS (123).

Hans MEYER (117) et OVERTON (132) avaient déjà mesuré le pouvoir anesthésique d'une substance en prenant la *concentration critique* de cette substance vis-à-vis des têtards, c'est-à-dire en calculant la quantité minimum d'anesthésique à mettre dans un volume d'eau déterminé pour produire l'anesthésie du têtard; en essayant les anesthésiques les plus divers ils ont établi que la valeur du coefficient de partage augmentait avec la valeur décroissante de la concentration critique.

NICLOUX (128) a confirmé ces recherches en dosant le chloroforme dans tous les tissus des animaux anesthésiés et c'est dans le tissu nerveux le plus riche en lipoïdes qu'il a retrouvé le plus d'anesthésique. Il a même constaté en outre (NICLOUX et Mlle FRISON) que la substance blanche, plus riche en lipoïdes que la substance grise, 15,2 % dans la blanche contre 8,2 dans la grise, était celle qui fixait le plus de chloroforme, 0 gr. 065 contre 0,039.

Cet auteur a résumé en un tableau la répartition du chloroforme dans les principaux organes, sang artériel, sang veineux, cerveau, moelle épinière, foie, rate, reins, cœur, muscles, etc. (1).

(1) Pour les détails, voir NICLOUX : *Anesthésiques généraux*, 1908.

POHL (136) a démontré qu'au moment d'une anesthésie au chloroforme, ce dernier se trouvait en proportion plus élevée dans les globules rouges que dans le plasma; c'est que les premiers renferment plus de lécithines et de cholestérine.

Le même fait se produit lorsqu'on administre de l'éther et du chloral ou de l'acétone. D'après P. GEUSLER (66), de Zurich, tous les hypnotiques indifférents se comporteraient de la même façon que les anesthésiques et il établit une concurrence entre le système nerveux et les tissus graisseux. Donc les anesthésiques agissent plus énergiquement sur les personnes maigres, et les personnes grasses seront plus difficilement endormies que les personnes maigres.

MOORE (120) et ROAF (147) n'admettent pas cette conception des anesthésiques. A la suite d'un grand nombre d'expériences sur la solubilité respective du chloroforme dans l'eau, les solutions salines et les matières protéiques (hémoglobine), ils arrivent à cette conclusion que: « l'action anesthésique est due à une combinaison d'ordre physique ou chimique entre l'anesthésique et les matières protéiques de la cellule (1) ».

En résumé : la solubilité dans les graisses est donc une condition essentielle de l'action anesthésique ou hypnotique. Comme, d'autre part, les phénomènes d'osmose règlent les échanges cellulaires, il est nécessaire qu'une substance soit soluble dans l'eau pour pénétrer dans le protoplasma et un anesthésique devra donc être à la fois légèrement soluble dans l'eau et dans les lipoides.

(1) D'après NICLOUX, *loco citato*.

Nature de l'action des anesthésiques

Il nous reste à déterminer maintenant la nature de l'action des anesthésiques et de voir si cette action est d'ordre physique ou d'ordre chimique.

Éliminons tout de suite cette seconde hypothèse. Il est difficile d'admettre une action chimique ; si les anesthésiques devaient former des complexes, ces complexes devraient être très instables puisque le retour à l'état normal est extrêmement rapide ; pour certains d'entre eux (protoxyde d'azote) on devrait trouver trace de ces complexes, car dans une combinaison chimique, aussi lâche soit-elle, il y a toujours une modification des substances en présence et les constituants perdent un peu de leur individualité. Ce n'est pas le cas avec les anesthésiques. Ces agents sont retrouvés tels qu'ils ont été absorbés et l'action cesse avec leur élimination ; c'est pourquoi on a pensé à assimiler les lipoïdes à des catalyseurs.

Preuves apportées en faveur de l'action d'ordre physique

HUGOUNENQ (78) admet que les phénomènes anesthésiques sont dus aux troubles apportés à l'état physique des lipoïdes. Pour lui les anesthésiques agissent grâce à leur « miscibilité » avec les lipoïdes, ils s'accumulent dans les tissus particulièrement riches qui les retiennent comme une éponge fixe l'eau (1). Or il n'est pas de milieu organique plus riche en lipoïdes que les centres nerveux.

(1) HUGOUNENQ, *Précis de chimie physiologique et pathologique*, page 110.

Il cite (1) l'expérience d'Hans MEYER (117) : « Celui-ci prit des grenouilles d'été (il avait déterminé, au préalable, sur ces grenouilles que les lipoides fondaient à 38°) et il les plongea dans de l'eau à 38°. Elles présentèrent immédiatement des phénomènes anesthésiques. Mises dans l'eau froide, elles reprirent aussitôt leur état normal. Hans MEYER conclut que les lipoides de grenouilles ont, à l'état normal, une consistance cireuse et protègent les cellules ; à 38°, l'état physique de ces lipoides étant modifié, l'anesthésie se produit ».

Ces faits ont suggéré à HUGOUNEQ (1) l'hypothèse que les phénomènes de dépression constatés chez les malades ayant des températures élevées (42° par exemple) seraient peut-être dus à la déliquescence que subiraient les minces couches formées par les lipoides, phénomènes ayant pour conséquence un contact anormal entre les cellules. Il est permis de se demander si les anesthésiques n'agiraient pas en dissolvant simplement les lipoides et en provoquant la rupture de l'équilibre colloïdal de la cellule. MELTZER (116) et AUER (2) ont montré que certaines substances, comme le chlorure de magnésium, qui détruisent l'équilibre chimique des substances nerveuses et troublent leur fonctionnement normal agissent comme hypnotiques. Tout dernièrement, K.-H. MEYER et H. HOPFF (118) viennent d'apporter un argument décisif en faveur de l'action physique des anesthésiques que nous venons de discuter. Ces auteurs ont montré que :

« Tous les corps à l'état gazeux produisent la narcose

(1) HUGOUNEQ, cours professé à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, 2^e semestre 1925.

(2) J. MELTZER et J. AUER, *An. journ. of physic.* 1905-1906.

quand ils sont dissous dans les lipoides cellulaires à une concentration moléculaire caractéristique pour chaque espèce animale, mieux pour chaque espèce cellulaire. Cette concentration moléculaire, nécessaire à la narcose, est une véritable « concentration critique ». Elle est sensiblement la même pour tous les gaz. Pour atteindre une concentration moléculaire identique, il faudra que les corps étudiés soient à une pression d'autant plus grande dans l'atmosphère inhalée que leur solubilité dans les lipoides est petite. Aussi, comme la solubilité de certains gaz dans les lipoides — l'étude de la solubilité de ces corps dans l'huile d'olive le montre — est extrêmement faible, faut-il, pour atteindre la concentration voulue en molécules dissoutes, mettre en œuvre de très fortes pressions. Il faut, par exemple, 50 atmosphères pour obtenir un effet identique avec le sulfure de carbone ».

C'est en tenant compte de ces principes que la narcose a été obtenue, par les auteurs précités, avec l'azote, le méthane, l'acétylène, l'éthylène, l'aldéhyde éthylique, le sulfure de carbone, le phénol et de nombreux carbures halogénés. Signalons que J. TRAUBE (166) avait admis, comme facteur déterminant des anesthésiques, l'action exercée par la tension superficielle sur la substance offerte à la cellule.

On peut donc conclure de toutes ces recherches, que c'est par une action « mécanique » que l'anesthésique agit (grâce aux lipoides) sur le protoplasma vivant.

CHAPITRE III

I. — Propriétés générales de la Cholestérine

Nous serons bref à ce sujet ; la thèse de GRIGAUT (39) est devenue classique et nous renvoyons pour plus de détails à cet ouvrage cité dans la bibliographie, ainsi qu'à la thèse de COLOMBIÈS (41).

On rencontre la cholestérine à peu près dans tous les organes, tissus ou liquides de l'organisme. Elle existe chez les végétaux à l'état de « phytostérines ».

Sa composition a été parfaitement élucidée grâce surtout aux travaux de WINDAUS (177).

Elle se présente sous forme de paillettes blanches nacrées insolubles dans l'eau, solubles dans l'alcool bouillant, le chloroforme, l'éther, les corps gras.

Elle a pour formule : $C^{27}H^{46}O + H^2O$.

Point de fusion : $148^{\circ}5$.

Lévogyre $d = -37^{\circ}1$ pour les solutions chloroformiques à 2 %.

Elle est tantôt libre, tantôt combinée à l'état d'éthers avec des acides gras élevés ou des protéines.

Elle se combine à la digitonine pour donner un précipité insoluble.

de la production dans les capsules surrénales et les corps jaunes.

Citons les principales réactions de la cholestérine que nous empruntons à M. le professeur L. HUGOUNENQ (1) :

1° Avec SO_4H^2 additionné de $1/5^\circ$ d'eau, on a à chaud une coloration rouge carmin qui, en présence de teinture d'iode vire au violet, puis au jaune, finalement au bleu en passant par le vert ;

2° Avec SO_4H^2 concentré, on a une matière colorante rouge soluble dans le chloroforme, la solution devient violette, bleue, puis enfin jaune ;

3° Evaporée à sec au bain-marie au contact d'un peu d'acide azotique, la cholestérine laisse un résidu jaune que l'ammoniaque fait virer au rouge vif ;

4° Evaporée doucement avec de l'acide chlorhydrique mélangé de chlorure ferrique, de chlorure d'or et de bichromate de potasse, on obtient un résidu violet (SCHIFF) ;

5° Avec 5 cc. d'une solution chloroformique de cholestérine, 1 cc. d'anhydride acétique, 1 goutte d'acide sulfurique concentré, on observe une coloration rose, puis rouge, bleue et enfin verte, assez stable pour permettre un dosage colorimétrique et présentant au spectroscope une bande d'absorption dans le rouge entre les raies B et C. Cette réaction est due aux oxycholestérines.

Origine : Une partie est d'origine exogène (aliments). Une partie est d'origine endogène. FLINT attribue au foie le rôle producteur de la cholestérine.

CHAUFFARD, LARROCHE et GRIGAUT (35) placent le centre

(1) L. HUGOUNENQ, *Précis de Chimie physiologique et pathologique* (Collection Testut).

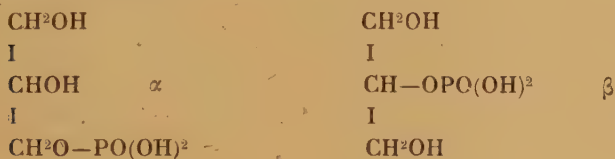
ABELOUS et SOULA (1) dans la rate. Mais on ignore encore la matière première dont part l'organisme pour produire la cholestérine.

Rôle : multiple, antihémolytique et antitoxique. Propriétés hydrophiles remarquables (lanoline).

II. — Propriétés générales des Lécithines

Les lécithines sont des lipoides phosphorés, ce sont des phosphatides contenant des acides gras non saturés.

Découverte par GOBLEY (67), en 1846, étudiée par LIEBREICH (101) en 1865, ses rapports avec la choline furent définitivement établis par DIAKONOW (50) et STRECKER (159) (1867-1868). Le noyau de la lécithine est l'acide glycérophosphorique qui existe sous deux formes isomériques α et β .



La première possède un carbone asymétrique, les deux autres fonctions alcool sont éthérifiées par des acides gras saturés et non saturés (acide oléique, palmitique, stéarique).

Comme beaucoup d'autres acides que ceux-ci, en particulier :

l'acide linoléique (2 doubles liaisons) ;

l'acide linolénique (3 doubles liaisons),

ont été rencontrés dans les mélanges de lécithines, le

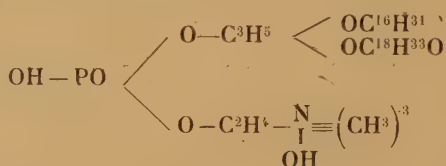
nombre de lécithines possible avec les 4 acides glycéro-phosphoriques :

2 inactifs,

2 optiquement actifs,

devient considérable.

La lécithine la plus fréquente est la lécithine oléopalmitique ; elle a donc pour formule :



Les lécithines ont été bien étudiées par COUSIN (42), FOURNEAU (62), WILLSTAETTER (176) et LÜDECKE (107), LEVENE (98), Mac LEAN (109), ROLLET (150), DELEZENNE (47), BILLON (17), DESGREZ (49) et elles contiennent toujours des traces de sel de calcium. Elles existent dans toutes les cellules animales et végétales et les liquides de l'organisme. Elles sont particulièrement abondantes dans le lait, le jaune d'œuf, le sperme, le cerveau, les capsules surrénales.

Propriétés. — Les lécithines sont des substances molles et cireuses, blanches, hygroscopiques, altérables, éminemment oxydables, se colorant à l'air, se gonflant dans l'eau en formant des solutions colloïdales. Elles sont solubles dans l'alcool absolu et même dans l'alcool à 90° ; solubles dans l'éther anhydre et surtout le mélange alcool-éther, le chloroforme, les carbures, les huiles, insolubles dans l'acétone. Elles sont précipitées de leurs solutions par le chlorure de cadmium.

Elles forment, avec les matières protéiques, des com-

plexes ou des produits d'absorption assez stables, ainsi qu'avec les sels de calcium, le glucose et, sans doute, avec la cholestérine (1). Elles présentent le phénomène de biréfringence (croix au microscope polarisant). Elles sont très facilement hydrolysées par les acides et les alcalis, ainsi que par la chaleur au-dessus de 50° ou une dessiccation prolongée.

Réactions principales. — Ce sont celles de ses produits de dédoublement, choline, qui se combine à l'iode pour former un periodure: Réaction de FLORENCE, réaction des acides glycérophosphoriques (DENIGÈS (48) et BAILLY (6)).

Avec les phénols, après oxydation, formation d'un dérivé de la dioxyacétone.

Avec la résorcline, coloration rouge.

Avec le gaïacol, coloration bleue.

Malgré les travaux de HUNDESHAGEN, GRUN et KADE, LANGHELD, la synthèse de la lécithine est encore à faire, la difficulté presque insurmontable étant l'étherification de la choline par l'acide glycérophosphorique.

Propriétés physiologiques. — La lécithine joue un rôle obscur, mais constant, dans presque tous les phénomènes biologiques. Citons les curieuses propriétés cytolytiques de la lysocithine (DELEZENNE (47) et FOURNEAU (62)).

Remarque : Par suite de la grande multiplicité des lécithines et de leurs rapports avec les phosphatides, nous avons défini ce que nous entendions par « lécithines » ; pour éviter toute confusion, nous entendrons

(1) Ce qui expliquerait les variations concomitantes de ces deux corps que nous avons observées au cours de nos expériences.

par lécithines : « les éthers glycérophosphoriques de la choline unis aux acides gras, solubles dans l'éther absolu après reprise, par ce solvant, de l'extrait alcoolique desséché à basse température ».

Ce que l'on entend par lécithines de l'œuf est un mélange de lécithine et de céphaline. Dans notre procédé d'extraction la céphaline est insoluble dans l'alcool. Par contre, malgré l'insolubilité théorique de la sphingomyéline dans l'éther, il en passe toujours un peu dans l'éther anhydre par suite de son « adsorption » avec les lécithines. Cette quantité étant toujours la même, les chiffres trouvés sont peut-être légèrement supérieurs aux chiffres théoriques, ce qui ne présente aucune importance pratique. Mais il était bon de définir ce que tous les biologistes entendent par « lécithines » du sang et des tissus lorsqu'ils dosent ces substances.

CHAPITRE IV

Etude des variations de la Cholestérine et des Lécithines dans les principaux organes et dans le sang du cobaye sous l'influence des Anesthé- siques généraux

ARTICLE I

Technique générale suivie pour l'extraction et le dosage des lécithines dans les tissus et dans le sang

Il nous a fallu plus d'un an pour arriver à mettre au point une méthode sûre et applicable à tous les organes et dans toutes les circonstances. Nous exposerons en détail les méthodes de prélèvement d'extraction et de dosage. Si cet exposé peut paraître superflu aux yeux de chimistes ou biologistes qualifiés, il servira certainement à tous ceux qui, n'ayant pas l'habitude du laboratoire et désireux d'entreprendre un travail sur ces données, cherchent dans les différents travaux une méthode sûre et rapide, facile à adopter.

Nous nous sommes rendu compte, en effet, que malgré les solides techniques trouvées et mises au point par

LAUDAT (91) (1), GRIGAUT (69) (2), P. LEMELAND (93) (3), BRAUNS et S. A. Mac LANGHLIN (24), il y avait toujours une modification à apporter.

Il ne faudra jamais perdre de vue que tout ce qui va suivre s'applique uniquement au dosage de la cholestérine et des lipoides phosphorés du type « lécithines ». Pour le dosage des lipoides totaux et des autres lipoides phosphorés, nous renvoyons aux excellents ouvrages ou mémoires des auteurs cités plus haut.

Nous diviserons donc cette partie de notre travail en trois paragraphes.

1° *Méthodes adoptées pour le prélèvement des organes ;*

2° *Méthodes générales d'extraction ;*

3° *Méthodes adoptées pour le dosage des lécithines.*

1° Méthodes adoptées pour le prélèvement des organes

1° *Matériel.*

Capsules en porcelaine tarées ou cristallisoirs tarés ;

Flacons d'Erlenmeyer tarés ;

Agitateurs caoutchoutés et mortiers en porcelaine biscuitée.

2° *Réactifs.*

Alcool absolu ;

Sulfate de soude anhydre exempt d'acide phosphorique.

Les organes doivent être prélevés immédiatement

(1) LAUDAT, *Thèse de doctorat en pharmacie*, Paris 1913.

(2) GRIGAUT, *Thèse de doctorat en médecine*, Paris 1913.

(3) LEMELAND, Recherches sur le dosage des lipoides dans le sang et les tissus (*Bulletin de la Société de Chimie biologique*, 1921 ; février 1923, tome V).

après la mort de l'animal, séchés rapidement à l'aide de papier filtre et pesés aussitôt. Cette précaution peut paraître superflue, pourtant avec des organes de faible poids comme la rate ou les capsules surrénales, une perte de poids est possible, surtout par les temps chauds; nous n'insisterons pas sur la minutie avec laquelle on doit débarrasser les organes des graisses adhérentes ou du péritoine (1). Il sera bon d'avoir, à côté de la balance, un petit flacon d'alcool absolu et de recouvrir les organes dès que la pesée sera effectuée.

Tous les cahiers de laboratoire seront préparés auparavant, avec inscription des organes en face de chaque cristalliseur ou flacon taré.

La tare de ces récipients sera vérifiée souvent.

1° MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT

Les organes pesés sont broyés tout de suite dans l'alcool absolu avec l'aide de quelques pincées de sulfate de soude anhydre; nous préférons ce dernier au sable qui est extrêmement difficile à entraîner lors du transvasement de l'organe broyé dans la cartouche de papier destinée à être introduite dans l'appareil à extraction; l'alcool absolu est préférable à l'alcool à 95°, l'eau contenue dans les tissus frais diminuant le titre de l'alcool employé, titre qui, pour certains organes (foie) peut subir un abaissement de plusieurs degrés.

LEMELAND, dans son mémoire, montre avec rai-

(1) Si l'on veut doser directement la cholestérine dans les tissus suivant la méthode de GRIGAUT, il faudra prélever une petite partie de l'organe pesé et tenir compte, dans le dosage des lipoides phosphorés, de la quantité d'organe enlevé.

son la nécessité de broyer les organes aussitôt extraits dans l'alcool pour annihiler les actions diastasiques capables d'hydrolyser une partie des lécithines ; nous avons comparé sa méthode à celle d'HEUBNER et nous avons pu constater la véracité de ses affirmations par une différence sensible dans les proportions de lécithines trouvées dans un même organe en opérant sur l'organe frais et sur l'organe desséché.

En prélevant les organes longtemps après la mort, les lipases et glycérophosphatidases augmentent pendant l'autolyse des organes et pendant la dessiccation ; l'auto-oxydation des phosphatides amène une insolubilité croissante dans certains solvants neutres, l'éther par exemple.

Nous rapporterons donc tous nos dosages au kilogramme d'organes frais ; il est évident que l'inconvénient de la dessiccation ne porte que sur les lécithines, la cholestérine ne paraissant pas influencée par la dessiccation.

Pour broyer les organes, employer au début le moins possible d'alcool absolu, une trop grande quantité d'alcool pouvant gêner beaucoup la désagrégation. Si l'extraction ne doit pas suivre immédiatement cette première opération, transvaser le mélange dans des flacons bien propres et secs, à large ouverture et bouchés émeri. Rincer soigneusement le mortier à l'alcool absolu et compléter à 125 cm³ au maximum. Les flacons seront étiquetés.

Si l'on veut doser la cholestérine dans le sang total, recueillir 5 cm³ de sang oxalaté.

Si l'on veut doser la cholestérine dans le sérum, recueillir 5 cm³ de sang, laisser coaguler, centrifuger.

2° Méthodes d'extraction

Matériel nécessaire :

- 1° Appareil de Kumagawa et Suto (en verre, genre Pyrex, autant que possible) ;
- 2° Cartouches en papier (Durieux) ;
- 3° Pierre ponce granulée.

Réactifs nécessaires :

Alcool absolu ;

Ether anhydre fraîchement distillé sur du sodium.

L'extraction des lipoides et, en particulier, les lipoides phosphorés, est certainement l'opération la plus importante dans les dosages que nous allons entreprendre ; une erreur commise pendant l'extraction se répercutera dans tous les dosages effectués ultérieurement.

Il était donc naturel de vérifier minutieusement si la méthode d'extraction et le solvant employés permettaient d'obtenir la totalité des lécithines et de la cholestérine, car nous avons pensé pour faciliter les opérations, à doser la cholestérine directement sur une partie aliquote de l'extrait alcoolique obtenu au moyen de l'appareil Kumagawa et Suto. Nous avons pu constater que les quantités trouvées dans ce cas n'étaient pas inférieures à celles obtenues par la méthode de Grigaut.

Cette méthode consiste, comme on le sait, à traiter au bain-marie bouillant un poids connu de tissu par l'alcool à 70° sodé jusqu'à désagrégation complète du tissu. Il est bon de surveiller, une mousse abondante pouvant amener des pertes.

Il ne suffit pas de mettre en contact les tissus broyés.

avec l'alcool bouillant, pour obtenir une extraction complète des lipoides, il faut opérer *la lixivation à chaud* de façon à faire passer une grande quantité de solvant sur la substance.

L'appareil de KUMAGAWA et SUTO (85) présente l'immense avantage d'effectuer l'épuisement par l'alcool chaud à une température bien supérieure à celle réalisée dans les autres appareils de lixivation à chaud (SOXHLET, ZULKOWSKI, etc.). L'appareil de BERNTROP (14), analogue à l'appareil de KUMAGAWA, est moins employé.

Il est indéniable que l'appareil de KUMAGAWA est beaucoup moins utilisé que le SOXHLET dans les laboratoires, et nous avons cherché à vérifier une fois de plus si en prolongeant considérablement l'extraction, le SOXHLET ne pourrait pas, à la rigueur, remplacer l'appareil de KUMAGAWA; nous avons fait deux parts égales d'un même organe (foie) broyé sans aucun adjuvant et nous avons soumis cet organe à un épuisement :

1° de 10 heures dans l'appareil de KUMAGAWA;

2° de 40 heures dans l'appareil de SOXHLET.

Les chiffres trouvés après épuisement au SOXHLET sont toujours inférieurs de 7 à 9 % aux chiffres trouvés au moyen de l'appareil KUMAGAWA et SUTO (1).

Nous conseillons d'employer un appareil en pyrex ; avec les appareils en cristal ordinaire, un accident est toujours possible malgré les plus grandes précautions.

(1) Moyenne des chiffres trouvés pour les lécithines (foie), 5 dosages sur 5 foies :

1° Extraction au SOXHLET (4 gr. substance), 32 gr. 20 par kilo, organe frais ;

2° Extraction au KUMAGAWA (4 gr. substance), 35 gr. par kilo, organe frais.

Nous ne décrivons pas l'appareil de KUMAGAWA qui est trop connu; disons simplement que le cylindre portant le siphon étant à l'intérieur de l'appareil est beaucoup moins fragile que celui du SOXHLET. Deux petites oreilles latérales permettent de retirer le cylindre avec un crochet de fil de fer. Le cylindre est destiné à recevoir la cartouche de papier qui contient la substance à traiter. Les douilles de papier françaises (DURIEUX) sont au moins aussi bonnes que les douilles anglaises ou américaines; une seule remarque: il est assez difficile de se procurer des douilles de même calibre que les cylindres du KUMAGAWA et il est nécessaire de plier la cartouche dans le sens longitudinal, non seulement avant d'introduire la douille en papier dans le cylindre, mais avant d'introduire dans la douille le tissu broyé. La cartouche pliée, traverser la partie supérieure à l'aide d'une longue épingle, mettre en suspension sur une éprouvette de 200 cm³, mouiller à l'alcool absolu et verser avec précaution dans la cartouche le tissu broyé dans l'alcool, détacher les parties qui pourraient adhérer au flacon à l'aide d'un agitateur muni d'une bague de caoutchouc; fermer la cartouche avec un tampon de coton hydrophile qui ne devra pas dépasser les bords de la douille et enfin introduire cette douille dans le cylindre de l'appareil de KUMAGAWA en ayant soin de laisser 1 cm. 5 d'intervalle entre le fond du cylindre et celui de la cartouche, ceci, afin de permettre un bon siphonage que l'on vérifiera au début de l'extraction.

Introduire le liquide alcoolique filtré dans le ballon de l'appareil et compléter avec de l'alcool absolu jusqu'à ce que le niveau arrive aux deux tiers du ballon; ajouter

quelques grains de pierre ponce et mettre l'appareil en marche.

L'extraction a lieu en huit heures en moyenne, mais il est toujours préférable de prolonger de quelques heures l'extraction (dix à douze heures en tout).

Il est nécessaire de se rendre compte si le résidu contient encore des lipoides et nous avons contrôlé par une digestion pepsique déjà préconisée par PFLÜGER (135) et ses élèves (DORMEYER (52) entre autres), que le résidu ne donne pas la réaction de LIEBERMANN (100), et que par l'alcool bouillant puis après évaporation à 40 degrés par l'éther anhydre, il ne fournit plus à l'analyse de lécithines.

Traitement de l'extrait alcoolique. — L'extrait alcoolique est transvasé chaud dans une fiole jaugée de 200 cm³ et on complète avec de l'alcool absolu, ce qui ramène l'extrait à une température d'environ 40° (1). Après agitation, 20 ou 30 cm³ sont prélevés pour servir, le cas échéant, au dosage de la cholestérine. Il est évidemment tenu compte de la quantité prélevée dans le calcul des lipoides phosphorés. Le reste de l'extrait alcoolique est distillé avec précaution jusqu'à volume de 30 cm³. Ces 30 cm³ sont transvasés à chaud dans un cristalliseur en verre de Bohême ou une capsule de porcelaine et évaporés dans le vide sulfurique à basse température (30 à 40°). Il faut avoir soin de ne pas dépasser 50°, ce qui amènerait une hydrolyse des lécithines.

L'extrait alcoolique bien séché est repris par l'éther

(1) Il est nécessaire de chauffer légèrement à cette température, l'extrait alcoolique se troublant et laissant déposer des graisses par refroidissement.

anhydre (1) (fraîchement distillé sur du sodium après contact de vingt-quatre heures).

L'épuisement de l'extrait est continué jusqu'à ce que l'éther n'abandonne plus de résidu. Les solutions éthérées réunies et centrifugées en plusieurs fois (2) sont introduites, après lavage du tube ayant servi à la centrifugation, dans un ballon de KJELDAHL, en pyrex, de 200 cm³ et évaporées à siccité au bain-marie électrique (dans une hotte à ventilateur électrique autant que possible pour éviter la fatigue due à la respiration continue de vapeurs d'éther). Cet extrait éthéré contient la totalité des lipoïdes phosphorés et des cholestérines libre et combinée. Il contient, en outre, la totalité des graisses neutres et des acides gras préexistants.

3° Méthodes adoptées pour le dosage des « lécithines »

1° *Minéralisation de l'extrait éthéré;*

2° *Dosage de l'acide phosphorique à l'état de phosphomolybdate de baryum.*

1° MINÉRALISATION DE L'EXTRAIT ÉTHÉRÉ (3)

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la minéralisation de l'extrait éthéré; nous n'en retiendrons que trois :

1° *Minéralisation par la poudre nitrée.*

(1) Il est bon de répartir l'éther anhydre en petits flacons de 125 cm³, dont le bouchon sera collodionné aussitôt.

(2) La centrifugation est préférable à la filtration. La filtration sur papier ou coton dégraissé, filtre d'amiante de KUMAGAWA, donne de mauvais résultats.

(3) Toutes ces méthodes sont minutieusement décrites dans le *Précis de Technique chimique*, de A. MOREL (Collection Testut).

Cette méthode a été décrite avec exactitude par MOREAU (121) (1). Elle consiste à traiter un poids connu d'échantillon desséché, dans une capsule de platine par deux fois son poids de poudre nitratée que l'on répartit dans toute la masse.

La formule de cette poudre est la suivante :

Nitrate de potasse pulvérisé.....	8 gr.
Carbonate de potasse pur anhydre.	1 gr.
Sodium	1 gr.

Le mélange est chauffé doucement et progressivement jusqu'à fusion, la substance est attaquée, des étincelles avec pétilllements indiquent la marche de la combustion. La masse, charbonneuse disparaît, le liquide s'éclaircit, on laisse refroidir et on reprend par de l'eau distillée. La conduite de l'opération est délicate et demande un tour de main si l'on veut éviter les projections.

Nous avons suivi la méthode de NEUMANN (127), nom impropre, puisque comme le fait remarquer avec juste raison GRIGAUT (69) (2), cette méthode est d'origine française; elle a été mentionnée pour la première fois par le pharmacien militaire MILLON, en 1864, utilisée dès 1889, par LAPICQUE (88), pour le dosage du phosphore dans le sang. Ce n'est qu'en 1897 que NEUMANN (127) a perfectionné et appliqué cette méthode.

2° Méthode de Millon dite de Neumann.

C'est la méthode classique de destruction sulfo-nitrique.

(1) MOREAU, *Thèse Faculté Méd. Lyon*, 1901.

(2) GRIGAUT, *Journal de Pharmacie et de Chimie*, février 1925, n° 3, page 101..

Récemment, 1924, BAUMANN (9) a reproché à cette méthode d'entraîner des pertes de phosphore par volatilisation d'acide phosphorique et proposé l'emploi de l'eau oxygénée à 30 % (1). Nous avons constaté que les pertes étaient dues à une conduite brutale et défectueuse de l'opération. Nous n'avons jamais observé de pertes en acide phosphorique en employant la méthode suivante (2) :

Marche de la minéralisation par la méthode sulfo-nitrique. — Introduire successivement dans le ballon de Pyrex contenant le résidu de l'extrait éthéré :

1° 1 cm³ d'eau distillée;

2° 4 cm³ du mélange suivant :

Acide sulfurique à 60°;	} partie égales.
Acide azotique pur;	

3° Une bille de verre;

fermer le ballon à l'aide d'un entonnoir à longue douille, disposer le ou les ballons sur grille de KJELDAHL, chauffer doucement à flamme basse jusqu'à décoloration; éloigner la flamme si la réaction devient trop vive, afin d'éviter le départ des vapeurs acides. Ajouter goutte à goutte le mélange sulfo-nitrique si la coloration brune persiste. Lorsque le liquide est décoloré ou simplement jaune, ajouter quelques décigrammes d'urée pour détruire

(1) M. le professeur LEULIER (95) nous avait indiqué, il y a plus d'un an, l'emploi du Perhydrol (eau oxygénée à 100 vol. pour 100) exempt d'acide phosphorique; il avait donc pensé, avant BAUMANN, au remplacement de la méthode azoto-sulfurique. Nous n'avons pas pu, malheureusement, essayer cette méthode, faute de Perhydrol exempt d'acide phosphorique.

(2) Il est bien entendu que tous les réactifs employés au cours des dosages seront soigneusement vérifiés au point de vue de l'acide phosphorique.

les vapeurs nitreuses, laisser refroidir, ajouter 60 cm³ d'eau distillée, enlever l'entonnoir et faire bouillir jusqu'à réduction de volume au demi.

L'ébullition a pour but de transformer en acide orthophosphorique les acides méta et pyrophosphorique qui sont formés au cours de la minéralisation.

Le contenu, après refroidissement, est filtré sur papier Prat-Dumas mouillé. Les acides gras qui n'auraient pas été détruits sont retenus par le filtre; on lave avec 20 cc. d'eau distillée. Le filtrat est entraîné dans un Becher en pyrex de 200 à 250 cm³.

2° PRÉCIPITATION DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE A L'ÉTAT DE PHOSPHOMOLYBDATE DE BARYUM (passage par le phosphomolybdate d'ammonium).

Matériel nécessaire :

- Becher en pyrex;
- Tubes tarés en pyrex pour centrifugeuse ;
- Agitateurs à extrémité caoutchoutée;
- Erlenmeyer à bec en pyrex.

Réactifs nécessaires :

- 1° Ammoniaque pure;
- 2° Acide azotique pur;
- 3° Solution de nitrate d'ammoniaque pur à 35 %;
- 4° Solution de molybdate d'ammoniaque pur à 3 % ;
- 5° Eau de lavage.

{	Acide azotique pur..	150 cm ³
	Nitrate d'ammonia-	
	que pur	50 cm ³
	Eau distillée	1.000 cm ³
- 6° Solution de ferrocyanure de potassium à 1/10;

7° Solution de chlorure de baryum à 20 %;

8° Solution d'ammoniaque à 10 %;

9° Acide sulfurique pur.

Nous discuterons plus loin la valeur des autres méthodes essayées. Nous donnons en premier lieu la méthode que nous avons suivie pour le dosage de l'acide phosphorique. Cette technique est une modification de celle indiquée par TREADWELL (167) dans son manuel de chimie quantitative et de celle de POSTERNAK (140), et nous avons vérifié plusieurs fois son exactitude comme en témoignent les chiffres suivants.

Analyses effectuées :

1° Sur une solution titrée de phosphate d'ammoniaque monobasique à 4 gr. 4369 par litre; 50 cm³ = 0 gr.10 de P²O⁵;

	Quant. théor.	Quant. trouvée.
Prise d'essai, 50 cm ³ ...	100 mg.	99,3
— 30 cm ³ ...	60 —	59,6
— 30 cm ³ ...	60 —	58,9
— 25 cm ³ ..	50 —	50
— 20 cm ³ ...	40 —	41
— 10 cm ³ ...	20 —	19,3
TOTAUX...	330 mg	327,1 mg

2° Sur une solution éthérée de lécithines à 50 0/00 :

Prise d'essai : Dosage au pyrophosphate de magnésie.

50 cm³ = 0 g. 2123 P²O⁵;

Prise d'essai: Dosage au phosphomolybdate de baryum:

50 cm³ = 0 g. 220 P²O⁵;

50 cm³ = 0 g. 218 P²O⁵;

La méthode est donc exacte, elle a l'avantage d'être

applicable en tous les cas, l'énorme poids moléculaire du phosphomolybdate de baryum :



permettant de doser les plus petites quantités de phosphore, ce que ne permet pas la méthode au pyrophosphate de magnésie $\text{P}^2\text{O}^5 \text{Mg}^2$.

Mode opératoire de la précipitation :

Le filtrat acide contenu dans le Becher, provenant de la minéralisation de l'extrait éthéré, est neutralisé par l'ammoniaque puis additionné d'acide azotique jusqu'à réaction faiblement acide. Ajouter par décigr. de P^2O^5 (1) :

30 cm³ de nitrate d'ammoniaque à 35 %;

20 cm³ de NO^3H .

Porter à l'ébullition. L'étuve à bain de sable de Schlœsing est très commode, elle permet de chauffer plusieurs Becher à la fois et il est facile de la régler en mettant un thermomètre dans un Becher rempli de sable, ce qui permet de lire à tout moment la température qui ne doit pas dépasser 110° autant que possible.

(1) TREADWELL donne les indications suivantes :

Il faut employer pour précipiter :

0 gr. 10 de P^2O^5 : 120 centimètres cubes de molybdate (30 centimètres cubes de NO^3NH^4 , 19 centimètres cubes de NO^3H) ;

0 gr. 01 de P^2O^5 : 15 centimètres cubes de molybdate (20 centimètres cubes de NO^3NH^4 , 10 centimètres cubes de NO^3H) ;

0 gr. 005 de P^2O^5 : 15 centimètres cubes de molybdate (20 centimètres cubes de NO^3NH^4 , 10 centimètres cubes de NO^3H) ;

0 gr. 002 de P^2O^5 : 10 centimètres cubes de molybdate (15 centimètres cubes de NO^3NH^4 , 5 centimètres cubes de NO^3H) ;

0 gr. 001 de P^2O^5 : 10 centimètres cubes de molybdate (15 centimètres cubes de NO^3NH^4 , 5 centimètres cubes de NO^3H).

Il ajoute, toutefois, constamment un léger excès. Ainsi, pour 0 gr. 06 de P^2O^5 , il emploie 90 centimètres cubes de molybdate, 25 centimètres cubes de nitrate d'ammoniaque et 15 centimètres cubes d'acide nitrique, et, pour 0 gr. 04 de P^2O^5 , il emploie 65 centimètres cubes, 25 centimètres cubes, 15 centimètres cubes des mêmes réactifs.

En même temps chauffer dans un autre Becher la quantité nécessaire de solution de molybdate d'ammoniaque, 1 cm³ par milligramme de P²O⁵ (en moyenne les quantités maximum de P²O⁵ dosées dans les organes du cobaye sont de 7 à 10 mg.).

Verser dans un entonnoir en verre muni d'un robinet et faire couler un mince filet, et en agitant, dans la solution chaude de phosphate. Le phosphomolybdate jaune précipite immédiatement, mais pour les petites quantités la précipitation complète n'est obtenue qu'au bout de plusieurs heures et non pas immédiatement, comme l'indique TREADWELL.

Le précipité se dépose au fond du Bécher; il est bon de prendre une partie de la liqueur surnageante, de l'additionner de réactif de Sonnenschein et de porter le tube au bain-marie pour vérifier si la précipitation de l'acide phosphorique est complète. Dans ce cas, on décante les deux tiers de la liqueur surnageante en prenant soin de ne pas entraîner le précipité, et on centrifuge dans un tube en pyrex taré. Le liquide surnageant est décanté à la trompe et le précipité est lavé au moyen de l'eau de lavage jusqu'à ce que le liquide décanté ne donne plus de coloration brune avec une solution de ferrocyanure de potassium (1).

A ce moment, dissoudre le précipité dans le tube même à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 10 % (2) et

(1) Le ferrocyanure donne, avec l'acide molybdique, un précipité ou une coloration brune suivant les quantités d'acide. Il est absolument indispensable d'éliminer complètement l'acide molybdique, cet acide donnant avec le chlorure de baryum un précipité blanc qui fausserait, par surcharge, le dosage de l'acide phosphorique.

(2) Privée de CO² par distillation sur de la chaux vive.

ajouter un excès (5 à 10 cm³) de solution de chlorure de baryum à 20 %. Il se forme immédiatement un précipité blanc de phosphomolybdate de baryum. Ce précipité est lavé par centrifugation à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 10 % (1) jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus de précipité blanc par un excès de SO_4H^2 .

A ce moment, décanner comme précédemment, sécher à l'étuve à 140° jusqu'à poids constant, mettre dans un dessiccateur à SO_4H^2 , laisser refroidir et peser à l'aide d'un pèse-filtre taré.

Le poids de précipité, divisé par 4,94, donne la proportion de lécithines dans la prise d'essai, calculée en distéaryllécithines.

Rapporter au kilogramme d'organe frais.

NOTA. — On peut calculer en lécithine oléopalmitique (P. M. 777), dans ce cas les chiffres trouvés sont évidemment légèrement inférieurs.

ARTICLE I *bis*

Critique des autres méthodes de dosage de l'acide phosphorique Leur manque de précision

Avant d'adopter la méthode que nous venons de décrire, nous avons successivement mis en œuvre les autres procédés de dosage employés pour voir s'il ne serait pas possible de concilier la rapidité et la simplicité avec l'exactitude.

Nous avons examiné :

- Les méthodes gravimétriques usuelles;
- Les méthodes volumétriques ;
- Les méthodes colorimétriques.

(1) Privée de CO_2 par distillation sur de la chaux vive.

A. — Méthodes gravimétriques

1° DOSAGE DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE A L'ÉTAT DE PYROPHOSPHATE DE MAGNÉSIE

Il est superflu de rappeler ici la parfaite exactitude de cette méthode: elle est malheureusement inapplicable au dosage de petites quantités d'acide phosphorique. Dans les expériences que nous avons entreprises, nous opérons en moyenne sur des prises d'essai contenant de deux à six milligrammes de phosphore et le poids de précipité de pyrophosphate de magnésie est trop faible, ce qui expose à d'inévitables erreurs.

Nous avons donc à regret abandonné ce procédé.

2° DOSAGE DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE PAR PESÉE A L'ÉTAT DE PHOSPHOMOLYBDATE D'AMMONIAQUE

On peut par cette méthode déterminer de très petites quantités de phosphore, car le poids moléculaire du phosphomolybdate d'ammoniaque est déjà considérable et l'on peut peser directement le précipité formé.

Plusieurs techniques ont été mises en œuvre.

LORENZ et PLUCKER (105) pèsent le phosphomolybdate après lavage à l'alcool et à l'éther et séchage à 100°.

D'autres dessèchent le précipité sans lavage à l'alcool et à l'éther. (FINKENER (58) dessèche le précipité à 160° dans un courant d'air jusqu'à poids constant.)

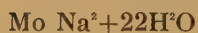
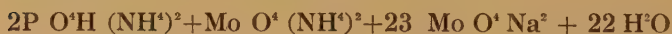
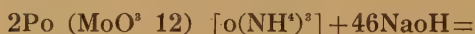
WOY (178) calcine légèrement le précipité jusqu'à obtention d'un résidu vert noirâtre qui n'est autre chose que de l'anhydride molybdique de composition $\text{PO}[(\text{Mo O}^3)^{12}]^2 \text{O}^3$ contenant 3,946 % d'anhydride phosphorique.

Toutes ces méthodes sont critiquables. Le produit desséché à 100° n'a pas de composition constante : VILLIERS et BORG (169) en 1893 ont bien montré que les résultats de cette méthode étaient satisfaisants, mais en se plaçant toujours dans les mêmes conditions. En opérant sur de petites quantités 0 gr. 09, 0 gr. 12, nous n'avons jamais trouvé le même poids. Et pourtant LAUDAT (91) affirme avoir obtenu d'excellents résultats.

La multiplicité des méthodes de dosage à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque démontre qu'aucune ne s'est imposée.

B.— Méthodes volumétriques

La méthode la plus connue est certainement celle de NEUMANN (127), IVERSEN (80) dont nous donnons ici le principe. Cette méthode consiste à dissoudre le précipité de phosphomolybdate d'ammoniaque bien lavé, par une quantité déterminée de soude-titrée; on porte le liquide à l'ébullition et on titre l'excès d'alcali par une solution acide de titre correspondant à la solution alcaline. La réaction en est la suivante :



46 NaOH = 2 atomes grammes de phosphore

1 cc. NaOH N/10 = 0,000 1348 gr. de phosphore.

BLAIR (19) a appliqué cette méthode au dosage alcalimétrique du phosphore dans le fer et l'acier.

LEULIER a montré que la formol-titration était applicable au dosage de l'acide phosphorique.

Il titre directement l'ammoniaque par la formol-titra-

tion au lieu de l'éliminer par distillation et ébullition et déduit de la quantité trouvée la proportion de phosphore précipité à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque. Cette méthode est excellente; elle ne peut pas être étendue à la micro-chimie (1).

Parmi les méthodes alcalimétriques, citons encore

(1) TECHNIQUE DE L'UTILISATION DE LA FORMOL-TITRATION POUR LE TITRAGE DE P^2O^5 .

Ceci dit, énumérons les recommandations que formule l'auteur en ce qui concerne la technique à suivre en vue d'utiliser la formol-titration au dosage de l'anhydride phosphorique précipité à l'état de phosphomolybdate d'ammonium.

A. — *Dilution des liqueurs de P^2O^5 .* — Pour obtenir une séparation rapide et complète de P^2O^5 à l'état de phosphomolybdate d'ammonium, il est nécessaire d'opérer sur un volume de solution phosphatique proportionné à sa teneur présumée en P^2O^5 . Ce volume doit être :

10 centimètres cubes pour les doses de 1 à 10 milligrammes ;
30 centimètres cubes pour les doses de 10 à 20 milligrammes ;
50 centimètres cubes pour les doses de 20 à 100 milligrammes.

B. — *Titre des liqueurs alcalines.* — Les liqueurs alcalines utilisées pour le dosage final doivent être à un titre d'autant plus faible que la quantité présumée de P^2O^5 est moins élevée. Il faut employer :

La soude N/20, pour des doses de P^2O^5 de 1 à 5 milligrammes ;
La soude N/10, pour des doses de P^2O^5 de 5 à 50 milligrammes ;
La soude N/2, pour des doses de P^2O^5 de 50 à 100 milligrammes.

C. — *Traitement du précipité molybdique et formol-titration.*

— Le précipité étant obtenu, on le lave une première fois avec une solution glacée contenant 1/20^e de réactif nitromolybdique (réactif de Sonnensheim). Cette liqueur sert aussi à rassembler le précipité sur le filtre. On évite, de la sorte, non seulement une filtration trouble, mais on se rend compte de la précipitation complète de l'acide phosphorique, car, dans le cas d'un déficit de réactif molybdique, il y a coloration immédiate du filtrat.

On continue le lavage avec de l'eau très refroidie dans la glace, jusqu'à ce que la liqueur filtrée ne donne plus qu'une teinte jaune très pâle avec le réactif de Nessler.

Il est indispensable de bien refroidir l'eau de lavage pour éviter tout passage de précipité à travers le filtre. Pour des doses de P^2O^5 de 5 à 10 milligrammes, cinq à six lavages avec 1 centimètre cube d'eau glacée suffisent généralement. Pour des doses supérieures, l'opération est plus longue, car la filtration est plus lente.

Le précipité lavé est introduit avec le filtre dans un vase à saturation, recouvert de 100 à 200 centimètres cubes d'eau distillée pure, suivant son importance. On dilacère le filtre, et le précipité est mis en suspension dans l'eau.

On verse alors rapidement de la soude normale jusqu'à disso-

celles de HEDENHÄIM, MAUERMAN, MOLINARI (1), PEMBERTON (1) et celle de CLARENS (38) qui dose l'ammoniaque recueilli par distillation.

A signaler encore la méthode de titrage à l'aide de l'azotate d'urane ou de l'acétate d'uranyle (*Pincus*), qui ne convient que pour des quantités assez fortes de phosphore.

C. — Méthodes colorimétriques (2)

Les méthodes colorimétriques sont très en faveur depuis les applications de la microchimie à la biologie. Certaines sont d'une précision indiscutable, nous le verrons plus loin au sujet du dosage de la cholestérine. Mais celles employées pour le dosage du phosphore donnent des résultats d'une exactitude « trop lointaine » pour que l'on puisse songer à les employer pour le

lution du précipité, dissolution qui s'apprécie très facilement par la clarification complète de la solution.

Après addition de phtaléine du phénol, on verse de l'acide chlorhydrique normal jusqu'à décoloration complète du liquide. Enfin, l'on revient à une légère teinte rose, à l'aide de la solution alcaline qui doit servir au titrage final.

C'est alors qu'il convient de verser le formol neutre au 1/2, soit, suivant la teneur présumée en P^2O^5 , 10 centimètres cubes pour des doses de 1 à 20 milligrammes, 20 centimètres cubes jusqu'à 50 milligrammes et 40 centimètres cubes au-dessus de ce chiffre. On verse ensuite la solution alcaline jusqu'à obtention d'une teinte rosée persistante (une minute) semblable à celle obtenue avant l'addition de formaldéhyde. Le nombre de centimètres cubes trouvé est augmenté de 1/30.

D. — *Calcul.* — Dans le précipité de phosphomolybdate d'ammonium, trois molécules de NH^3 correspondent à 1/2 P^2O^5 . Un litre solution normale correspondra donc à 1/3 de demi-molécule

de P^2O^5 , soit $\frac{71}{3} = 23,666$. De ce chiffre, il est facile de déduire

la valeur de 1 centimètre cube de soude normale, demi-normale, normale décime et normale vingtième.

(1) *Journal de Pharmacie et de Chimie*, t. xxx, série v, p. 43, et t. xviii, série ii, p. 184.

(2) La méthode de Copaux a été mise en œuvre par plusieurs chimistes, à leur entière satisfaction.

dosage du phosphore lipoïdique dans les tissus : elles ne devraient entrer en jeu que lorsque les autres méthodes sont défaillantes. Leur rapidité et leur élégance donnent malheureusement souvent la forte tentation d'en généraliser l'emploi.

Nous ne citerons que les principales :

Misson (119) en 1907 avait déjà donné une méthode de dosage colorimétrique du phosphore basée sur la formation de vanado-phosphomolybdate d'ammoniaque.

R.-D. BELL et E. DOISY (11) en 1920 utilisent la réduction opérée sur l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone en présence de carbonate et de sulfite de soude pour comparer avec une solution type la coloration bleue qui se développe, en prenant toutes les précautions nécessaires pour que l'excès d'acide molybdique ne donne pas lui aussi un produit de réduction bleu.

DENIGÈS (48) en 1921 a décrit une méthode céruléo-molybdique avec emploi du protochlorure d'étain récemment préparé.

En 1903, E. MANCEAU et ZIZINE, dans le laboratoire du professeur CHAUFFARD (35) ont cherché, en collaboration avec GRIGAUT (69), si cette réaction ne pourrait pas servir à la mise au point d'une méthode de dosage des lécithines dans le sang.

Dans les *Archives de Médecine et de Pharmacie Militaire*, n° 4, octobre 1923, E. MANCEAU avait décrit cette méthode, attendant que de nombreux essais en justifient la valeur (1); aussi avons-nous vu avec surprise que, dans un article original paru en février 1924 (2), A. GRIGAUT

(1) Ce qui justifiera le nom que nous lui donnerons toujours dorénavant : MÉTHODE DE A. GRIGAUT, ZIZINE et E. MANCEAU.

(2) A. GRIGAUT. *Journal de Pharmacie et Chimie*, 1^{er} février 1924.

avait publié cette méthode sans citer ses collaborateurs.

Nous nous contenterons de citer le titre du chapitre décrivant cette méthode, six mois avant la publication de GRIGAUT : *Dosage colorimétrique. Méthode inédite employée actuellement au laboratoire de M. le professeur CHAUFFARD, et à l'édification de laquelle l'un de nous contribuera en collaboration avec MM. GRIGAULT et ZIZINE. Principe de la méthode A. GRIGAUT, ZIZINE et E. MANCEAU*

Cette méthode n'est appliquée qu'au dosage des lécithines dans le sang; elle consiste à détruire par l'alcool-éther les complexes protéolécithides et après filtration et séchage au bain-marie de l'extrait, à reprendre plusieurs fois par l'éther anhydre. Les solutions éthérées et centrifugées réunies dans un ballon de KJELDAHL en pyrex, sont évaporées. On minéralise par le mélange sulfo-nitrique. On reprend par l'eau et après ébullition le phosphore des lécithines est dosé colorimétriquement au moyen de la réaction céruleo-molybdique de DENIGÈS.

Quatre précautions sont à prendre :

- 1° Neutraliser exactement par la soude à 40 % ;
- 2° Refroidir et compléter à volume déterminé (50 cc.);
- 3° Ajouter à la solution-type de phosphate d' Az.H^+ monobasique la même quantité de soude qui sera neutralisée par SO_4H^+ 1/3 en présence d'une goutte de phénol phtaléine à 0,30 % ;
- 4° Refroidir cette solution-type et compléter à volume déterminé (50 cc.).

Les réactifs nécessaires sont les suivants :

- 1° *Solution étalon de phosphate titrée à 0,044369 par litre de phosphate d'ammoniaque monobasique*

obtenue par dilution d'une solution mère 100 fois plus forte.

5 cc. de cette solution correspondent à 1 mg. 50 de lécithine oléopalmitique (poids moléculaire 777,9).

2° *Réactif sulfo-molybdique* de composition suivante :

Solution de molybdate d'Az.H⁴ à 10 % — 20 cc.

Acide sulfurique pur à 66° — 20 cc.

3° *Réactif stanneux* :

Etain en feuilles 0 gr. 10.

Acide chlorhydrique pur et concentré 2 cc. 3.

MODE OPÉRATOIRE. — Dissoudre au bain-marie bouillant et ajouter : eau distillée, quantité suffisante pour 10 cc.

Ce réactif ne se conserve que quelques jours (3 à 5); il doit être renouvelé souvent.

Ajouter dans la solution à titrer et la solution-type :

Réactif sulfo-molybdique..... 2 cc.

Réactif stanneux..... 0 cc. 5.

Mélanger, laisser en contact deux minutes et comparer au moyen du colorimètre de DUBOSQ. Si cette méthode est rapide, elle a le gros défaut d'être extrêmement délicate; la stabilité de la couleur bleue est faible; les couleurs bleues sont beaucoup plus difficiles à comparer que les jaunes; enfin, la plus petite variation d'acidité ou de température cause dans le dosage des écarts considérables et notre erreur a toujours été supérieure à celle (3 %) indiquée par A. GRIGAUT dans son article.

Nous donnons ci-contre les différences de poids de « lécithines » constatées chez le cobaye normal, en comparant la méthode au phosphomolybdate de baryum à la méthode colorimétrique.

Variations des Lécithines dans la méthode céruléo-molybdique

(Cobayes normaux)

Numéros d'ordre des animaux expérimentés.....		1	2	3	4	5
Dates des prélèvements et analyses.....		Janv. 1924	Fév. 1924	Mars 1924	Mars 1924	Mars 1924
Poids total de chaque animal.....		700 gr.	310 gr.	360 gr.	810 gr.	605 gr.
Capsules surrénales	POIDS DE L'ORGANE FRAIS..	0.38	0.21	0.306	0.4501	0.3633
	Lécithines par kilog d'organe frais (en grammes).	200 »	180 »	120 »	160 »	140 »
Cerveau...	POIDS DE L'ORGANE FRAIS..	4.61	2.5	2.20	5 »	4.06
	Lécithines par kilog d'organe frais..	85 »	55 » (?)	80 »	90 »	80 »
Foie.....	POIDS DE L'ORGANE FRAIS..	30 »	14.20	16.07	30.60	26.77
	Lécithines par kilog d'organe frais.....	56 »	54 »	81 »	61 »	49 » (?)
Poumons	POIDS DE L'ORGANE FRAIS..	5.10	3.06	2.90	5.54	4.98
	Lécithines par kilog d'organe frais.....	49 »	40 »	30 » (?)	70 »	44.10
Reins.....	POIDS DE L'ORGANE FRAIS..	6.93	3.35	3.48	6.45	6 »
	Lécithines par kilog d'organe frais.....	48.50	52.05	46.20	56.5	81.50
Rate.....	POIDS DE L'ORGANE FRAIS..	0.83	0.36	0.42	0.98	0.64
	Lécithines par kilog d'organe frais.....	40 »	36 »	44 »	38 »	48.50
Sang : Poids de lécithines par litre....		1.06 (?)	2.24	1.40	1.20	1.30

Signalons pour finir un travail de N.-V.-W.-R. BLOOR qui applique la néphélométrie à la détermination du phosphore en utilisant un réactif au molybdate de strychnine agissant sur le liquide provenant de la minéralisation de l'extrait éthéré. Nous renvoyons, pour plus de détails, au mémoire original. Notons toutefois que l'opalescence la plus satisfaisante est celle qui se produirait avec 0,03 mg. d'acide phosphorique dans 50 cc. de suspension finale, soit 0,15 mg. dans l'échantillon soumis à l'analyse. Il faudra donc prendre des quantités de liquide qui contiennent approximativement cette quantité d'acide phosphorique.

Nous n'avons pas essayé cette méthode.

ARTICLE II

Technique suivie pour l'extraction et le dosage de la Cholestérine dans les tissus et dans le sang

1° Si les méthodes colorimétriques employées pour le dosage de l'acide phosphorique sont sujettes à caution, il n'en est pas de même pour le dosage de la cholestérine. La Méthode de GRIGAUT (69) est devenue classique ; elle est simple, rapide, exacte ; c'est pourquoi nous l'avons employée. Nous n'entrons pas dans les détails de cette méthode ; elle est minutieusement décrite dans la plupart des manuels.

a) *Dans les tissus.* — Il faut désagréger un poids de tissu variant de 0 gr. 20 à 1 gramme (suivant la teneur en cholestérine) par l'alcool à 70°, sodé, à la tempéra-

ture du bain-marie. On chauffe jusqu'à ce que le tissu soit dissout et que le volume initial, 30 cc., soit ramené à 15 cc. Il faut surveiller de façon à retirer du feu si le liquide mousse trop, ce qui amènerait des pertes.

On introduit alors dans le cholestérimètre et on extrait la cholestérine à l'aide de l'éther qui, séparé (1), lavé et évaporé, laisse un extrait que l'on reprend par 5 cc. de chloroforme.

On pratique alors la réaction de LIEBERMANN (100), 2 cc. anhydride acétique, 3 gouttes de SO_3H^2 et au bout d'une demi-heure on compare la teinte verte avec celle fournie par une solution chloroformique titrée de cholestérine dans les mêmes conditions (2).

Le procédé est exact.

Si l'on opère sur l'extrait alcoolique on prend 10 cc., et au lieu d'ajouter 13 cc. d'alcool sodé à 0,50 % on ajoute 3 cc. d'une solution d'alcool sodé, ces 3 cc. renfermant une proportion de soude égale à la quantité contenue dans 13 cc. d'alcool sodé à 0,50 %

b) *Dans le sang.* — Si l'on opère sur le sérum, on traite directement 2 cc. de sérum par 13 cc. d'alcool sodé. En 1913, une autre méthode colorimétrique a été proposée par AUTENRIETH et FUNK (3).

2° DOSAGE PAR PESÉE

A) Méthode de GRIGAUT (69).

Le principe consiste à détruire les combinaisons pro-

(1) Il faut avoir soin de ne pas agiter vigoureusement pour éviter l'émulsion du liquide ; faire couler simplement l'eau de lavage le long des parois.

(2) La lecture peut se faire soit par dilution, soit par comparaison des deux solutions au colorimètre.

(3) AUTENRIETH et FUNK : Méthode colorimétrique. (*Munich. Méd. Wochens.*, 1913, n° 23, p. 1243.)

téiques de la cholestérine par une saponification partielle pratiquée directement sur le sérum.

B) *Méthode de WINDAUS* (1910) (177).

Elle met à profit la propriété que possède la digitonine de se combiner à la cholestérine pour former un complexe à peu près insoluble dans l'alcool à 95° froid.

Les éthers sont détruits par épuisement des organes au moyen de l'appareil de KUMAGAWA (85).

C) *Méthode de BETCHOV* (1923) (16).

Citons BETCHOV dont le procédé de dosage de la cholestérine est basé sur la propriété que possède ce lipoïde de fixer les saponines.

Cette méthode ne paraît pas très exacte et est peu employée.

CHAPITRE V

Etude des variations de l'Adrénaline dans les capsules surrénales du cobaye sous l'influence du chloroforme et du propylène

A la suite des variations de la cholestérine et des léci-
thines constatées dans les capsules surrénales sous l'in-
fluence des anesthésiques généraux, M. le professeur
HUGOUNENQ (78) nous a conseillé de rechercher si ces
troubles n'étaient pas dus à l'influence de l'adrénaline.

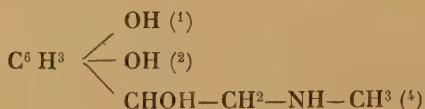
Nous avons donc dosé l'adrénaline dans les capsules
surrénales de plusieurs cobayes normaux et de plusieurs
cobayes anesthésiés au chloroforme, de 2 cobayes anes-
thésiés au propylène. Nous nous proposons de pousser
plus tard à fond ces recherches si nous avons le bonheur
de mettre au point une méthode précise de dosage de
l'adrénaline. Malgré tous nos efforts, il nous a été impos-
sible de mettre en évidence la présence d'adrénaline dans
le sang.

Avant d'exposer la technique que nous avons suivie,
rappelons quelques propriétés de l'adrénaline.

ARTICLE PREMIER

I. — Propriétés générales de l'Adrénaline

L'adrénaline est une pyrocatechine substituée. Elle a pour formule :



Entrevue par VULPIAN en 1856, elle a été isolée par TAKAMINE et ALDRICH en 1901.

C'est une poudre blanche cristalline altérable par la lumière qui la colore en brun, saveur amère, elle fond à 263°.

Sa solubilité dans l'eau est faible, elle est insoluble dans l'alcool, mais soluble dans les acides dilués, grâce à sa fonction basique, propriété que nous utiliserons pour l'extraire des capsules.

Sa synthèse, réalisée en 1904, a fourni le composé dextrogyre beaucoup moins actif (15 fois moins. CUSHNY).

C'est un corps réducteur.

La glande fraîche en renferme de 0,10 à 0,17 %. C'est un vaso-constricteur énergique. Il suffit de 0 mg. 0013 du chlorhydrate pour élever la pression artérielle. Cette sensibilité de l'ordre du millionième de milligr. a été utilisée pour déceler l'adrénaline dans le sang.

L'adrénaline donne de nombreuses réactions colorées.

PRINCIPALES RÉACTIONS COLORÉES (1)

1° En solution neutre ou légèrement acide, le *perchlorure de fer* la colore en vert émeraude, virant au violet et au rouge par addition ménagée de potasse. Les colorations sont fugaces.

2° *Les oxydants* (chlore, iode, ferricyanure, nitroprussiate de soude et ammoniaque, action de l'air à la longue) colorent l'adrénaline en rouge, en violet et finalement en brun. Il en est de même avec l'eau iodée ; si on enlève l'excès d'iode par l'éther, la sensibilité est de 1/150.000°.

3° *Le chlorure mercurique*, en solution dans l'eau ordinaire, donne une coloration rouge (nous utiliserons cette réaction pour tenter un dosage colorimétrique dans les capsules surrénales du cobaye).

4° *L'acide phosphotungstique*, préparé suivant les indications de FOLIN, donne avec l'adrénaline une coloration *bleue* intense. La sensibilité est de l'ordre de 1/3.000.000°, malheureusement cette réaction est commune à l'acide urique avec une sensibilité moindre toutefois (1/1.000.000°).

Enfin, certaines diastases oxydantes (poche à encre de la sèche, tyrosinase de la russula délica) donnent une coloration rouge.

(1) D'après HUGOUNENQ, *Précis de chimie physiologique et pathologique*. Collection TESTUT.

ARTICLE II

Technique générale suivie pour l'extraction et le dosage de l'Adrénaline dans les Capsules surrénales

1° *Procédés d'extraction.*

2° *Dosage colorimétrique dans les capsules surrénales
fraîches du cobaye.*

1° Procédés d'extraction

Ces procédés consistent en principe à broyer les capsules surrénales fraîches en présence d'eau acidulée par les acides sulfurique et chlorhydrique.

Gabriel BERTRAND (15) emploie l'acide oxalique en présence d'alcool à 95°. Nous donnons ici le principe de sa méthode : la liqueur traitée par l'acide oxalique et l'alcool, puis filtrée, est concentrée dans le vide pour chasser l'alcool, lavée à l'éther de pétrole, précipitée exactement par l'acétate de plomb et centrifugée. La solution limpide, faiblement colorée en jaune, est distillée dans le vide jusqu'à réduction à 100 cm³ et additionnée d'un petit excès d'ammoniaque; l'adrénaline précipite à l'état cristallin. Elle est purifiée par reprise au moyen de l'acide sulfurique à 10 % et de l'alcool et reprécipitée par l'ammoniaque. L'adrénaline est alors lavée à l'eau et à l'alcool et desséchée dans le vide.

Il n'est pas nécessaire de suivre rigoureusement cette méthode si l'on veut simplement faire un dosage colorimétrique de l'adrénaline. Octave BAILLY (6) a donné

récemment, dans le *Journal de Pharmacie et de Chimie*, une méthode permettant le dosage rapide de l'adrénaline dans les poudres de surrénales. Cette méthode utilise une réaction colorée que GRIMBERT et LECLÈRE (70) avaient proposée pour la caractérisation de l'apomorphine en 1915 et que DENIGÈS (48), en 1918, a étendue à la recherche et au dosage colorimétrique de l'adrénaline. La sensibilité de cette réaction est de l'ordre du millionième.

Voici la technique à laquelle nous nous sommes arrêtés pour faire nos dosages colorimétriques dans les capsules surrénales du cobaye. Les chiffres trouvés figurent plus loin à la fin du chapitre.

Ces chiffres nous paraissent un peu faibles. Nous reprendrons plus tard la question afin de savoir si l'extraction de l'adrénaline a été bien complète.

2° Dosage de l'adrénaline dans les capsules

surrénales fraîches

Les capsules pesées sont broyées avec dix fois leur poids de sulfate de soude desséché jusqu'à disparition totale des surrénales. On ajoute trois gouttes normales d'acide sulfurique normal, puis 4 cm³ d'eau distillée ; on broie et on introduit le mélange dans un petit Erlenmeyer bouché à l'émeri. Avec 4 autres cm³ d'eau distillée, ajoutés par petites portions, on rince le mortier et on verse dans l'Erlenmeyer. On mélange et on laisse un quart d'heure en agitant. On complète ensuite à 25 cm³ avec de l'eau distillée, on agite de temps en temps en

laissant en contact 1/4 d'heure. Au bout de ce temps, on filtre.

On prélève 10 cm³ du filtrat que l'on met dans un tube à essai contenant 1 gr. d'acétate de soude. On agite jusqu'à dissolution ; on ajoute trois gouttes de solution de bichlorure de mercure à 5 %, on retourne le tube deux ou trois fois. Une teinte rose se forme *assez lentement*. On compare, après quinze minutes, avec une solution titrée d'adrénaline à 0,01 %.

Adrénaline à 0,01 %.....	100 cm ³
Alcool à 95°	50 cm ³
Acide sulfurique normal....	1 cm ³
Eau distillée	Q. S. p ^r 100 cc.

MODIFICATION: En diazotant la naphtylamine α et copulant avec l'adrénaline on obtient une teinte ocre susceptible d'être appliquée au dosage de l'adrénaline dans les 25 cm³ de filtrat avec plus de sensibilité que la réaction à l'acétate de soude et au sublimé corrosif.

Cette réaction obtenue par M. Jean REY, pharmacien, élève à l'Ecole du Service de Santé, n'a pas pu être étudiée à fond ; elle le sera au cours des mois qui vont suivre, ce qui permettra d'en déterminer exactement la valeur.

Voici, actuellement, le mode opératoire suivi :

On utilise une solution de naphtylamine α :

Naphtylamine α	0,1
Acide acétique.....	20 cc.
Eau distillée	100 cc.

et une solution de nitrite de potassium à 10 %.

Dans 10 cc. du filtrat, on ajoute 3 gouttes de solution de nitrite de potassium et 3 gouttes de naphthylamine. La teinte se forme assez lentement (dix minutes, un quart d'heure), temps après lequel elle se stabilise et permet la comparaison.

On opère de même et simultanément sur une solution d'adrénaline de titre connu.

DOSAGE DE L'ADRÉNALINE

Surrénales du cobaye normal		Surrénales du cobaye chloroformé	
Poids des organes	Adrénaline par kilog organes frais (en grammes)	Poids des organes	Adrénaline par kilog organes frais
0 gr. 50	0 gr. 25	0 gr. 31	0 gr. 21
0 35	0 31	0 175	0 129
0 49	0 30	0 19	0 18
0 45	0 30	0 47	0 24
0 18	0 335		
0 15	0 341		

Méthode Key

CHAPITRE VI

Recherches expérimentales

ARTICLE I

Application au Cobaye normal

Dosage de la cholestérine et des lécithines dans :

LES CAPSULES SURRÉNALES ;

LE CERVEAU ;

LE FOIE ;

LES REINS ;

LES POUMONS ;

LA RATE ;

LE SANG.

Nos expériences ont porté sur 10 cobayes mâles, les femelles fécondées pouvant avoir un état lipœidique troublé.

Tous nos animaux ont été tués à jeun afin de rendre les résultats comparables. Nous donnons ici des chiffres dont quelques-uns ont déjà été publiés récemment (1).

(1) P. MANCEAU, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, n° 19, du 5 juin 1925.

Les lécithines sont exprimées en distéaryllécithines.

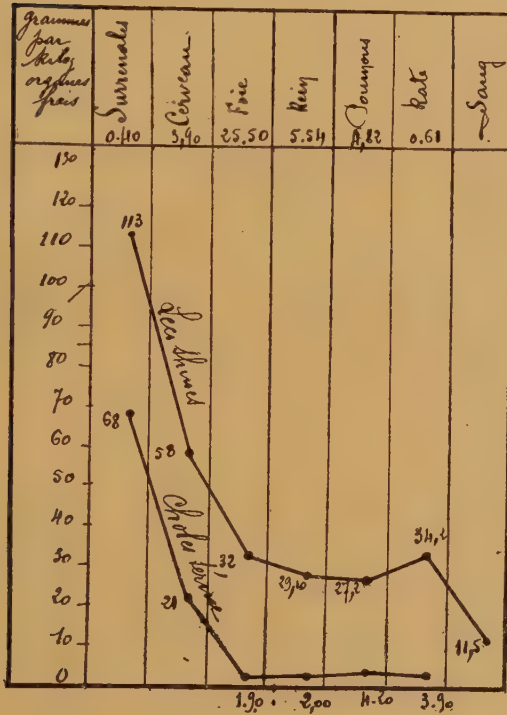
Diminuer de $1/26^e$ les poids si l'on veut exprimer en lécithines oléopalmitiques.

Ces dosages ont été effectués sur une période de six mois ; quelques-uns datent de 1924. Il est à remarquer que si les quantités trouvées diffèrent quelque peu, par suite des différences de méthode, l'allure générale de la courbe reste la même.

OMS des ORGANES	POIDS TOTAL des COBAYES NORMAUX EN GRAMMES	POIDS d s ORGANES FRAIS EN GRAMMES	CHOLESTÉRINE PAR KILOG. D'ORGANES FRAIS EN GRAMMES	LÉCITHINES PAR KILOG. D'ORGANES FRAIS EN GRAMMES
Foie	N° 2 570	25,50	Moyenne : 2,10.	Moyenne : 37,51
	N° 3 855	30,255		
	M° 4 730	29,08		
	N° 5 410	18,76		
	N° 6 630	28,21		
	N° 7 380	17,10		
	N° 8 480	14,10		
	N° 10 928	14,38		
Reins	N° 2 570	5,54	Moyenne : 2,00	Moyenne : 32,7
	N° 3 855	6,801		
	N° 4 730	6,33		
	N° 5 410	4,10		
	N° 6 630	6,565		
	N° 7 380	3,68		
	N° 8 480	4,54		
	N° 10 928	6,60		
Rate	N° 2 570	0,61	Moyenne : 3,58	Moyenne : 35,48
	N° 3 855	1,05		
	N° 4 730	0,77		
	N° 5 410	0,482		
	N° 6 630	0,62		
	N° 7 380	0,438		
	N° 8 480	0,44		
	N° 10 928	0,536		

NOMS des ORGANES	POIDS TOTAL des COBAYES NORMAUX EN GRAMMES	POIDS des ORGANES FRAIS EN GRAMME	CHOLESTÉRINE PAR KILOG D'ORGANES FRAIS EN GRAMMES	LÉCITHINES PAR KILOC. D'ORGANES FRAIS EN GRAMMES
Surrénales	N° 2 570	0,40	Moyenne : 62,12	Moyenne : 119,4
	N° 3 855	0,4835		
	N° 4 730	0,463		
	N° 5 410	0,31		
	N° 6 630	0,44355		
	N° 7 380	0,26		
	N° 8 480	0,27		
	N° 10 928	1,438		
Cerveau	N° 2 570	3,90	Moyenne : 23,71	Moyenne : 61,25
	N° 3 855	4,254		
	N° 4 730	4,54		
	N° 5 410	3,06		
	N° 6 630	3,886		
	N° 7 380	2,90		
	N° 8 480	4,18		
	N° 10 928	4,136		
Poumon	N° 2 570	4,82	Moyenne : 4,38	Moyenne : 33,04
	N° 3 855	4,80		
	N° 4 730	3,91		
	N° 5 410	3,47		
	N° 6 630	3,51		
	N° 7 380	3,12		
	N° 8 480	3,46		
	N° 10 928	4,415		

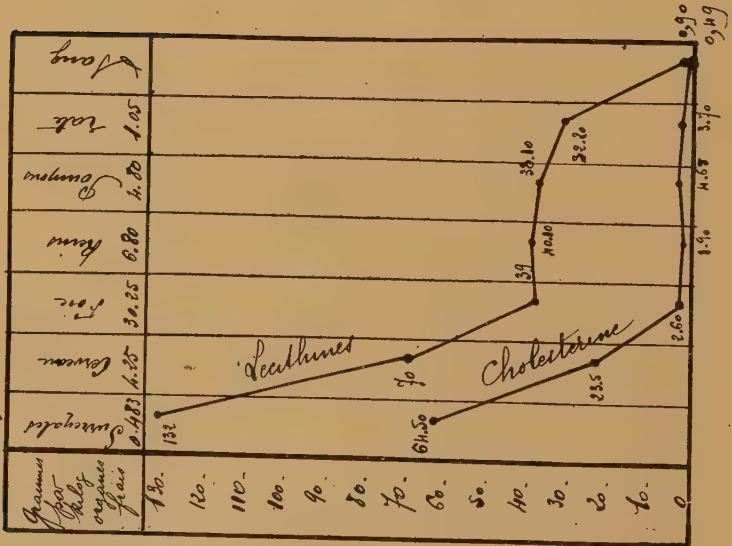
Cobaye normal N° 2. Poids : 750 gr.



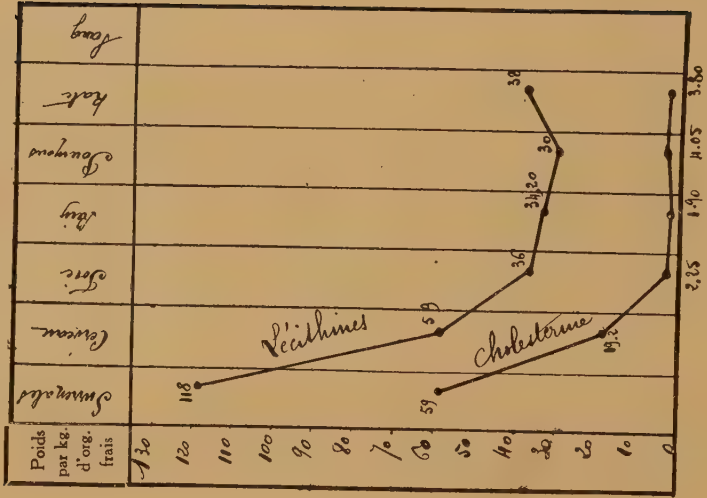
Méthode au phosphomolybdate d'ammoniaque :

- 1° Les poids de lécithines et de cholestérines sont portés en ordonnées ;
- 2° Les chiffres indiqués sous les noms des organes représentent les poids de ces différents organes.

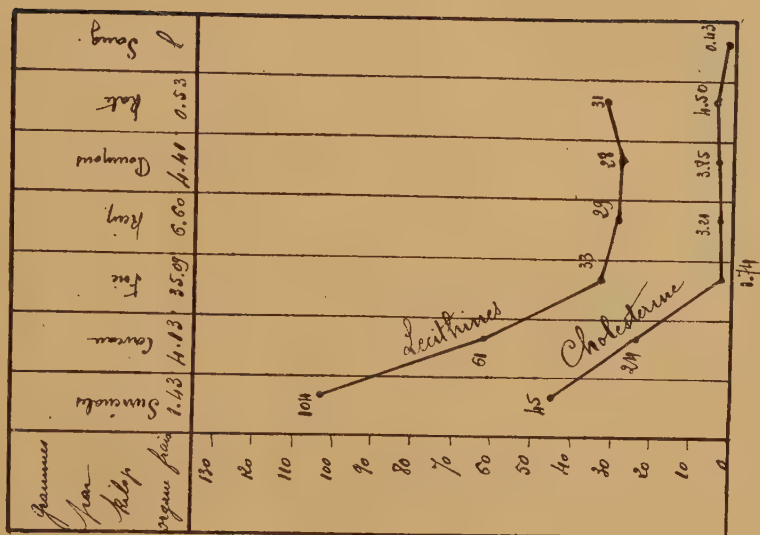
Cobaye normal N° 3. Poids : 855 gr.



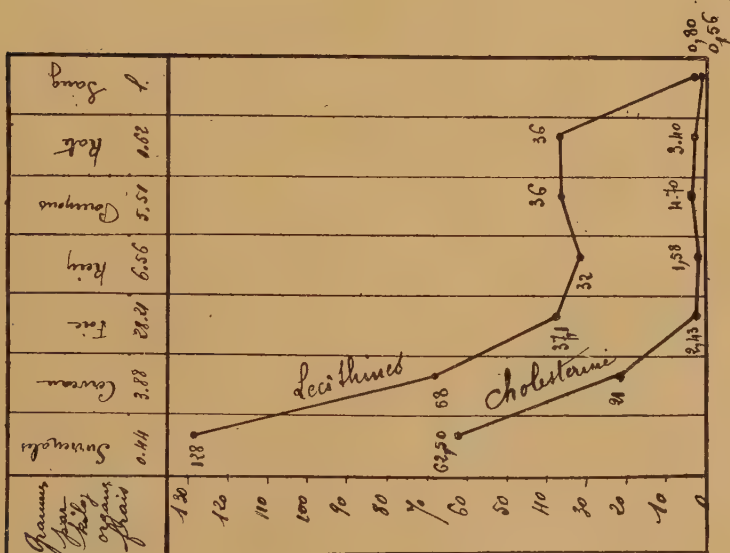
Cobaye normal N° 4. Poids : 730 gr.



Cobaye normal N° 10. Poids : 928 gr.
Dosages effectués par M. E. Manceau
Pharmacien-Major, Hôpital de Vichy



Cobaye normal N° 6. Poids : 630 gr.



ARTICLE II

Application au Cobaye anesthésié par le Chloroforme

MODE OPÉRATOIRE.

Les cobayes ont été anesthésiés sous une cloche à l'aide d'un tampon de coton hydrophile imbibé de chloroforme. L'anesthésie a été entretenue pendant quinze minutes. Les animaux, cloués sur une planche, ont été ouverts sous chloroforme et tués par section de l'aorte. 5 cc. de sang avaient été prélevés auparavant par ponction du cœur.

NOTA. — Il est bien entendu que tous les cobayes expérimentés ont été choisis parmi des cobayes mâles et à jeun depuis la veille.

Cette remarque s'applique, une fois pour toutes, à tous les anesthésiques expérimentés.

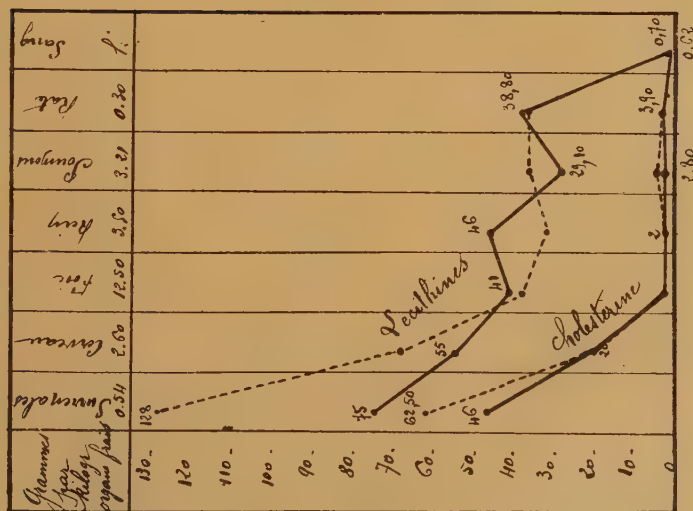
ARTICLE III

Application au Cobaye anesthésié par l'Ether

MODE OPÉRATOIRE.

L'anesthésie a été conduite, comme précédemment, avec le chloroforme. Ces deux anesthésiques ont agi très rapidement.

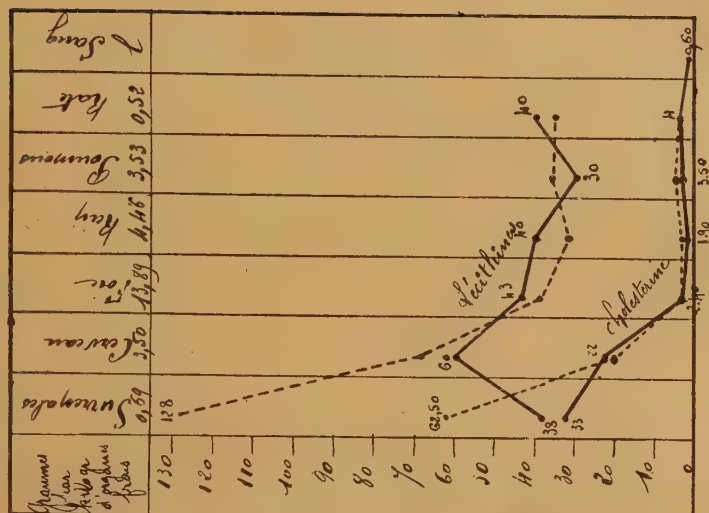
Cobaye anesthésié par CHCl³. Poids : 352 gr.



Cobaye anesthésié par CHCl³. Poids, 435 grammes
(Poids par kgr organe frais)

	LÉCITHINES	CHOLESTÉRINE
Surrénales (poids 0,48).....	65	33
Poumons	38,80	1,80
Rate	24,10	4,60

Cobaye anesthésié par CHCl³. Poids : 490 gr.



- 1° Les deux lignes pointillées indiquent les proportions de lécithines et de cholestérine dans le cobaye normal ;
- 2° Les poids de lécithines et de cholestérine sont portés en ordonnées ;
- 3° Les chiffres indiqués sous les noms des organes représentent les poids de ces différents organes.

ARTICLE IV

Application au Cobaye anesthésié par le Protoxyde d'Azote

A. — Préparation du protoxyde d'azote pur

Nous avons préparé le protoxyde d'azote par la méthode classique de décomposition par la chaleur de l'azotate d'ammonium. Il est difficile de se procurer ce gaz dans le commerce.

MONTAGE DES APPAREILS.

Dans un ballon de 500 cm³ en « pyrex », nous introduisons du nitrate d'ammonium cristallisé. Le bouchon porte un tube de sûreté en S, un thermomètre gradué jusqu'à 360° affleurant la surface du bain et un tube de dégagement. Le gaz se rend à un flacon laveur à eau distillée (1) et, de là, successivement, à un laveur contenant une solution de soude et, enfin, à un dernier laveur contenant une solution de sulfate ferreux. Ces deux réactifs absorbent les acides et les oxydes supérieurs de l'azote qui se produisent dans la décomposition du nitrate. Enfin, le protoxyde purifié se rend dans un gazomètre de REGNAULT.

MODE OPÉRATOIRE.

Le ballon contenant le nitrate d'ammonium est chauffé lentement. Il fond vers 152° (TROOST) et se décompose en protoxyde d'azote et eau vers 210°. Nous maintenons

(1) Ce flacon est nécessaire et n'est pas indiqué dans les techniques car, en cas de retour, la soude décomposerait l'azotate d'ammonium avec énorme dégagement d'ammoniaque.

la température entre 210 et 220°. La décomposition du nitrate étant exothermique, nous diminuons le feu dès que la réaction est commencée : une trop grande élévation de température donnerait, en effet, de l'azote et des oxydes supérieurs en quantité prépondérante. Tous les produits de décomposition du nitrate d'ammonium étant volatils, le ballon se trouve vide en fin d'opération ; c'est pourquoi un peu avant la fin et pour éviter l'absorption, nous retirons de l'eau le tube à dégagement qui arrive au gazomètre. 80 grammes de nitrate d'ammonium donnent environ 20 litres de protoxyde d'azote.

B. — Anesthésie

L'expérimentation a porté sur 4 cobayes : nous avons élevé de $1/5^{\circ}$ la tension du mélange. Proportion d'oxygène : $1/8^{\circ}$. Anesthésie rapide, sommeil calme, réveil extrêmement rapide ; deux animaux ont repris en quelques dizaines de seconde leur état normal. Deux cobayes ont été complètement analysés.

ARTICLE V

Application au Cobaye anesthésié par l'Acétylène

I. — *Préparation de l'acétylène pure.*

II. — *Anesthésie.*

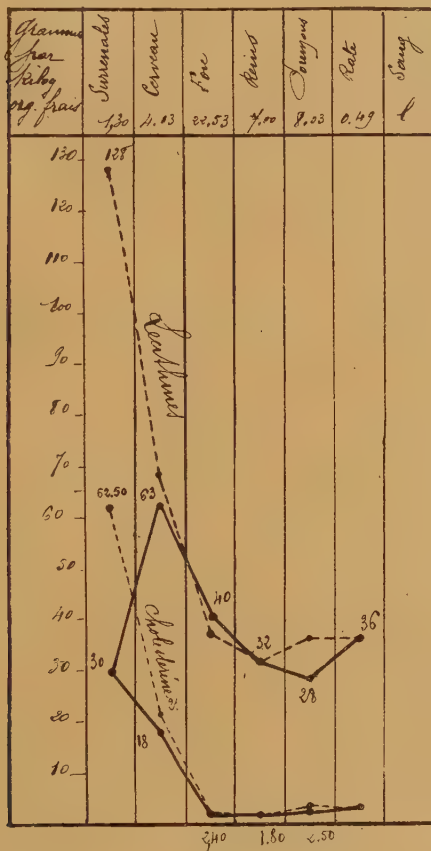
I. — Préparation de l'acétylène

1° PRÉPARATION DIRECTE PAR ACTION DE L'EAU SUR LE CARBURE DE CALCIUM

Dans un ballon à fond rond en Pyrex, nous plaçons du carbure de calcium du commerce. Le bouchon porte

Cobayes anesthésiés par N^oO

Moyenne des 2 cobayes. Poids: N^o 1, 680 gr.; N^o 2, 630 gr.



un tube à brome contenant de l'eau distillée que nous faisons tomber goutte à goutte sur le carbure. A la suite du ballon, nous avons mis quatre flacons laveurs pour débarrasser l'acétylène des composés sulfurés et phosphorés, H^2S PH^3 , produits dans la décomposition du carbure; ils contiennent successivement: de l'eau de Brome, une solution chlorhydrique de sublimé, de la soude diluée et de l'eau distillée. De là, l'acétylène purifiée se rend dans un gazomètre de Regnault. La réaction est très régulière et l'acétylène purifiée produite ne possède plus aucune odeur désagréable.

2° PRÉPARATION INDIRECTE PAR L'INTERMÉDIAIRE DE L'ACÉTYLURE CUIVREUX

a) *Préparation de l'acétylure cuivreux.*

L'acétylène produite, après passage dans les laveurs précités, est absorbée par une solution de chlorure cuivreux préparée suivant les proportions indiquées par WEYL: 1 gr. de sulfate de cuivre est dissout dans un peu d'eau; on ajoute 4 centimètres cubes d'ammoniaque à 20 % et 3 grammes de chlorhydrate d'hydroxylamine; on agite et complète à 50 cc.. L'acétylène se combine au cuivre et l'acétylure cuivreux forme un précipité rouge.

b) *Préparation de l'acétylène à partir de l'acétylure cuivreux, suivant la technique de JUNGFLAISCH.*

L'acétylure cuivreux lavé et formant une bouillie épaisse est placé dans un ballon portant un tube à brome dans lequel nous mettons de l'acide chlorhydri-

que. Nous faisons tomber ce dernier goutte à goutte dans le ballon. L'acétylène se dégage et se rend à un laveur à soude diluée qui retient l'acide chlorhydrique, et, de là, au gazomètre Regnault.

N. B. — On aurait pu également utiliser l'acétylène vendue dans le commerce sous forme d'une solution sous pression dans l'acétone qui à 10 atmosphères en dissout jusqu'à deux cents fois son volume; mais nous avons préféré purifier nous-même notre acétylène.

II. — Anesthésie

Mélange...	{	Acétylène	30 litres
		Oxygène	10 litres
		Surpression	»

Le premier essai a été infructueux et les trois cobayes soumis à l'influence de l'acétylène ne dormaient pas après trois quarts d'heure, les organes n'ont pas été analysés; à noter toutefois un *rein rouge caractéristique*.

Le deuxième essai a été en partie couronné de succès; nous avons élevé fortement la tension du mélange acétylène+oxygène : 1 partie oxygène pour 8 parties d'acétylène.

Les premiers symptômes de l'anesthésie n'ont apparu qu'au bout de dix minutes; le réveil s'est fait une demi-minute après la sortie de la cloche. C'est certainement ce gaz qui nous a donné les plus mauvais résultats.

ARTICLE VI

Application au Cobaye anesthésié par l'Ethylène

A. — Préparation de l'Ethylène

Nous avons préparé l'éthylène selon la technique donnée par JUNGFLEISCH.

Dans un ballon de deux à trois litres à fond plat, on place un mélange de 25 gr. d'alcool et de 150 gr. d'acide sulfurique concentré, de façon que le fond seulement soit recouvert. Le bouchon laisse passer un tube de sûreté à entonnoir plongeant dans le liquide et un tube à dégagement. On chauffe doucement, et dès que l'éthylène commence à se dégager, on laisse tomber goutte à goutte par le tube de sûreté un mélange d'une partie d'alcool pour deux parties d'acide sulfurique.

L'éthylène passe dans un laveur à soude diluée pour retenir SO^2 et CO^2 qui se forment, et dans un laveur à $\text{SO}^4 \text{H}^2$ concentré pour retenir les vapeurs d'éther. L'éthylène est reçu dans un gazomètre de Regnault.

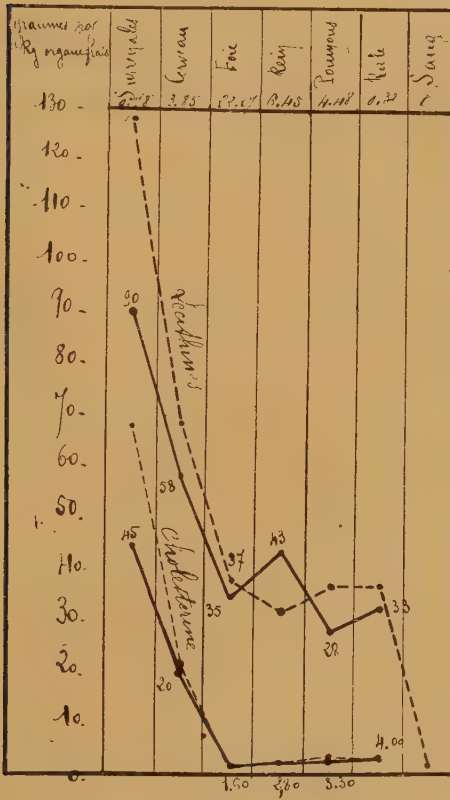
B. — Anesthésie

<i>Mélange..</i>	{	<i>Ethylène</i>	33 litres
		<i>Oxygène</i>	8 litres

Les cobayes sont anesthésiés sous une cloche avec une surpression $1/5$ atmosphère, anesthésie rapide ; légère période d'excitation, sommeil calme — réveil rapide.

Sur les trois animaux expérimentés, l'animal témoin reprend son état normal en demi-heure.

Cobaye anesthésié par l'acétylène. Poids : 688 gr.
(tué éveillé)



ARTICLE VII

Application au Cobaye anesthésié par le Propylène

A. — Préparation du Propylène à partir de l'alcool isopropylique

On introduit 100 gr. d'acide phosphorique sirupeux et des débris de verre dans un ballon Pyrex d'un litre de capacité muni d'un bouchon de caoutchouc neuf. Le bouchon laisse passer :

- 1° la tige d'une ampoule à Brome effilée en tube capillaire à son extrémité;
- 2° un thermomètre marquant jusqu'à 360°;
- 3° un tube à dégagement.

Sur le tube à dégagement est ménagée une ampoule pour condenser les vapeurs entraînées. Le gaz passe à travers deux flacons laveurs : un laveur à soude diluée et un laveur à eau distillée.

MODE OPÉRATOIRE

L'acide est chauffé vers 220-250° et par l'ampoule à Brome on laisse tomber goutte à goutte l'alcool isopropylique. Il se produit des dégagements brusques de gaz et on constate alors au thermomètre des variations correspondantes de la température de l'acide. Avec 100 cc. d'acide phosphorique, on peut préparer environ vingt litres de propylène. En continuant, l'acide devient tellement sirupeux que les soubresauts de la masse risquent souvent de faire éclater le ballon.

NOTA. — Le ballon, l'ampoule à brome, le thermomètre doivent être bien secs.

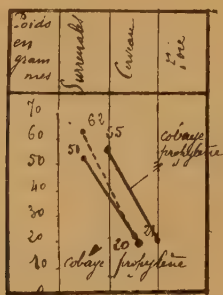
Le gaz est recueilli dans un gazomètre de Regnault.

B. — Anesthésie

Propylène 45 litres *Oxygène* 4 lit. 5

L'anesthésie a eu lieu sous une cloche en communication avec le gazomètre contenant 45 litres de propylène; nous avons réalisé la pression avec l'eau et un ballon d'oxygène; proportion d'O 1/10. Les résultats ont été excellents; l'anesthésie s'est produite très rapidement. Peu de symptômes d'excitation. Sommeil et respiration calmes; nous avons prolongé l'anesthésie pendant plus de 3/4 d'heure pour l'un des cobayes; aucun accident ne s'est produit. Le réveil est rapide, moins rapide toutefois qu'avec l'éthylène ou le protoxyde d'azote.

Nous nous proposons de reprendre sur d'autres animaux l'expérimentation de cet anesthésique qui ne paraît pas toxique et pourrait remplacer avantageusement le protoxyde d'azote.



Variation de la cholestérine dans les surrénales de 2 cobayes anesthésiés par le propylène.

CHAPITRE VII

Discussion des résultats

Les nombreuses déterminations que nous avons faites sur le cobaye normal nous permettent de voir si les relations quantitatives de la cholestérine et des lécithines *sont constantes*, ce qui établirait une constance cellulaire du plus haut intérêt biologique. Ce problème a été traité avant nous, par MAYER et SCHAEFFER, pour quelques organes et ces auteurs ont montré, ainsi que E. TERROINE, la constance de la concentration en lipoides dans les différents tissus des animaux et ils ont établi que cette concentration est caractéristique des organes. C'est ainsi qu'ils ont trouvé pour le cobaye la teneur suivante :

Teneur moyenne de 100 gr. de tissu (humide)

en Plipoidique (calculée en P)

<u>Foie</u>	<u>Rein</u>	<u>Poumons</u>	<u>Muscle</u>
0,148	0,124	0,135	0,053

Il y a un véritable « plateau » pour le foie; le rein, le poumon et la rate.

Les résultats que nous avons trouvés concordent pleinement avec ceux de ces auteurs; nous trouvons, en certains cas, une proportion légèrement plus faible, mais l'allure générale de la courbe reste la même. Ces différences tiennent probablement aux deux méthodes (phosphomolybdate de NH_4 , phosphomolybdate de baryum) que nous avons successivement employées.

W.-R. BLOOR a montré que dans le sang la lécithine et la cholestérine tendent à maintenir un rapport constant l'une vis-à-vis de l'autre. Il y a donc une relation entre ces deux corps et la graisse; si l'équilibre est troublé par l'absorption de graisse, il est vite rétabli par l'élimination de l'élément perturbateur ou par l'élévation du taux des constituants des lipoides.

Mais ce qui nous a frappé au cours de nos recherches c'est la chute presque constante des lécithines, de la cholestérine et de la l'adrénaline dans les capsules surrénales sous l'influence des anesthésiques, chloroforme, protoxyde d'azote (le propylène agit moins). Nous avons constaté souvent une augmentation de poids des capsules et nous nous demandions si la vaso-constriction, due au chloroforme, en retenant le sang dans les surrénales n'augmentait pas leur poids, ce qui aurait rendu les variations constatées plus apparentes que réelles. Nous n'avons pas maintenu cette hypothèse. Dans plus de 60 % des cas il n'y a pas de variation sensible dans le poids moyen des surrénales. En dosant l'eau dans les capsules, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de différence sensible chez le cobaye normal et le cobaye anesthésié.

Comme l'affirment ABELOUS, SOULA et COLOMBIÈS, la rate joue un rôle dans le métabolisme de la cholesté-

rine; il en est de même pour la cortico-surrénale qui intervient aussi dans le métabolisme des lécithines.

Ce rôle est-il cholestérinogène, comme l'affirment CHAUFFARD et ses élèves ?

Est-ce un rôle de fixation ? (ASCHOFF).

Est-ce un rôle d'élaboration des lipoides complexes aux dépens d'éthers, de la glycérine et de la cholestérine ? (CIACCIO).

Ces trois hypothèses rapportées par POLICARD (1) ont toutes les trois leur valeur et de nouvelles recherches avec d'autres agents jetteront peut-être un peu de lumière sur ce point.

A noter aussi une diminution variable de la cholestérine et des lécithines dans les poumons des animaux anesthésiés.

(1) POLICARD : *Précis d'histologie*. Collection TESTUT.

CONCLUSIONS

I. — Les anesthésiques généraux agissent nettement sur les *lipoides*, la *cholestérine* et les *lécithines* en particulier.

II. — Tous modifient plus ou moins la biologie des capsules surrénales.

III. — Il y a un abaissement de la cholestérine et des lécithines sous l'influence du chloroforme. Cet anesthésique est celui qui produit les plus fortes variations ainsi que le protoxyde d'azote. Il y a souvent augmentation de poids des capsules surrénales.

IV. — Pour l'éther, l'éthylène, l'acétylène, les variations paraissent moins fortes surtout en ce qui concerne les *lécithines*. Le propylène ne produit pas de variations sensibles.

V. — L'*adrénaline* semble diminuer dans les capsules surrénales sous l'influence des anesthésiques.

VI. — Les capsules surrénales jouent un rôle certain dans le métabolisme de la cholestérine et des lécithines.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
H. HUGOUNENQ.

Vu :
LE DOYEN,
JEAN LEPINE.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 24 Juin 1925.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
J. CAVALIER.

BIBLIOGRAPHIE

(Les chiffres placés en regard des noms des auteurs correspondent aux chiffres entre parenthèses placés dans le texte à la suite de ces mêmes noms.)

1. ABELOUS et SOULA (C.). — *Sociét. biol.*, 1920 : Fonction cholestérinogène de la rate.
1. ABELOUS et SOULA (C.). — *Acad. Sciences*, 1920 : Fonction cholestérinogène de la rate.
1. ABELOUS et SOULA (C.). — *Acad. Sciences*, 1924 : Fonction cholestérinogène de la rate.
2. ADAMS. — *Anc. J. Q. Suppl. Anesth.*, N.-Y., 1922 : Facteurs influençant l'anesthésie générale.
3. ARCHANGELSKI.
4. *Archives médecine et pharmacie militaire*, novembre 1918 : Comptes rendus sur l'anesthésie.
5. ARLOING. — Paris, 1879 : Recherches expérimentales comparatives sur action du chloral, chloroforme, éther avec ses applications pratiques.
6. BAILLY (O.). — *Journ. de Phys. et Ch.*, 1915 : Constit. acide glycérophosphor. dérivé par hydrolyse partielle des lécithines de œuf et cerveau.
7. BANG (Ivar) et FORSSMANN. — *Beitrag, z. Chem. Physiol. und Pathol.*, 1906, VIII^e.
8. BARSCHALL et BAUR. — *Arch. kais. Gesunda Amt.* 30, p. 54 à 62 : Elimination albuminoïdes pour extraire graisses.
- 8 bis. BARRAL (E.). — *Précis d'analyse chimique*. Baillière.

9. BAUMANN (E.). — *Journ. Of. Biol. Chemistry*, 1924, LIX, p. 667 : On the estimation of organic phosphorus.
10. BAUN (F.). — *Archiv. fur exper Pathol. und Pharmakologie*. L. XIII, 1899 : Zür theorie der Alkoholnarkose.
11. BELL et DOISY. — *Jour. of. Biol. Chemistry*, 1920, XLIV, p. 55 : Rapid colorimétric methods for the determination of phosphorus in urine and blood.
12. BERGELL. — *Berichte der deutsch. Chem. Gesellsch* : Propriétés des lécithines.
13. BERTHELOT et JUNGFLEISCH. — *Journal de Physique et Chimie*, 1871 : Coefficient de partage.
14. BERNTROP. — *Zeitsch. f. Angew. Chem.*, p. 122, 1902 : Epuisement produits deshydratés pour extraction corps gras du sang.
15. BERTRAND (Gabriel). — Préparation de l'adrénaline.
16. BETCHOV. —
17. BILLON. — Lécithine.
18. BINET. — *Presse Médicale*, Paris, 1918 : Appareil circulatoire dans l'anesthésie générale.
18. BINET. — *Journal médecine franç.*, Paris, 1920 : t. IX, p. 355-359 : Etude physiologique des anesthésiques.
19. BLAIR. — *Analysis of Iron and Steel*: Dosage alcalimétrique du P. dans le fer et dans l'acier.
20. BLANCHARD. — Paris, 1870 : Anesthésie au protoxyde d'azote par la méthode Paul Bert.
21. BLOMFIELD (J.). — London, 1918 : Travaux récents sur les anesthésiques.
22. BLOOR (W.-R.). — *Journal biol. chem.*, 1920 : Phosphates sanguins dans les lésions produites par anémie expérimentale chez le lapin.
22. BLOOR (W.-R.). — *Journ. biol. ch.*, t. XLVI, 1921 : Equilibre des lipoides dans le sang.
22. BLOOR (W.-R.). — *Bull. soc. chimie biologique*, oct. 1921 : Méthode néphélométrique pour la détermination du

phosphore contenu dans de petites quantités de sang.

23. BOUSSINGAULT-VERGE (W). — *Stadels jahresberisch über die Fortschritte der reuinem chemie*, t. s., p. 31, 1877 : Dosage par pesées du phosphore dans les lipoides phosphorés.
24. BRAUNS (D.-H.) et LANGHLIN (J.-A.-Mac). — *Am. Chem. Soc.*, 1920 : Dosage des phosphatides.
25. BRISSEMORET. — *Société biologique*, 29 janvier 1921 : Sur la cholestérine.
26. BRODIER. — *Paris chirurgie*, 1921 : Choix actuel des anesthésiques en chirurgie.
27. BROWN et HENDERSON. — *Canad. Med. Assoc. Journ.*, Mars 1923.
27. BROWN et HENDERSON. — *Archiv. Inter. Pharm. et Ther.*, 1924, t. XXVIII, p. 257.
28. BUCKMASTER. — *Proc. Roy. Soc. Med.*, London, 1917 : Considérations sur la physiologie de l'anesthésie par le chloroforme.
29. BURCHARD. — *Inaug. Dissertat. Rostock*, 1889 : Dosage colorimétrique de la cholestérine.
30. BURGE (W. E.). — *Am. J. Surg., Suppl. Anesth.*, N. Y. Q., 1919 : Comment les anesthésiques produisent l'anesthésie.
31. BUROW. — *Zeitsch. f. physiol. chem.*, p. 343, 1877 : Méthodes de dosages des lipoides phosphorés.
32. CALMETTE, MASSOL et BRETON. — *Acad. des Sciences*, 1908 : Variations des phosphatides au cours de cas pathologiques.
33. CARDOT et LAUGIER. — *Compte rendu Soc. de Biol.*, Paris, 1922 : Anesthésie par injections intraveineuses d'un mélange alcool-chloroforme, solut. physiologique chez le chien.
34. CARNOT. — *Annales du Muséum*, 9^e série, 3-5, 1893 : Dosage pesées du P des lipoides phosphorés.

35. CHAUFFARD, LARROCHE et GRIGAUT. — *Société de biol.*, t. LXXVI, p. 525 : Recherches sur teneur en cholestérine des capsules surrénales dans les différ. états pathologiques.
35. CHAUFFARD, LARROCHE et GRIGAUT. — *Société de biol.*, 1918 : Teneur en cholestérine aux différents stades de la vie fœtale.
35. CHAUFFARD, LARROCHE et GRIGAUT. — *Congrès de Méd.*, Bruxelles, 1920 : Lipoides en pathologie. Lipoides circulants, lipoides fixes.
36. CHEVREUL. — *Annales Muséum, Hist. naturelle*, 1823 : Etude des corps gras du sang.
37. CHOQUARD. — *Bern. Munschen R. Oldenbourg*, 64 pages 1914 : Uber die Narkose lipoïdreicher und lipoïd. armer gewebe gleicher art.
38. CLARENS.
39. CLEUDON.
40. COLLISON. — *Journ. of biological Chemistry*, n° 3, p. 217, 1912 : Dosage du phosphore des lécithines.
41. COLOMBIÈS (H.). — *Thèse de Toulouse*, 1924 : La cholestérine et son métabolisme.
42. COUSIN (A.). — *C. R. Soc. biol.*, 1906 : Propriétés des lécithines.
42. COUSIN (J.). — *P. C.* 18 (102), 1906 : Composition des lécithines.
43. CRILE. — *J. Am. M. Ass. Chicago*, 1916 : Recherches expériment. sur la marche de l'anesthésie par l'oxyde nitreux et éther.
44. DARIC (M.-J.). — *Sociét. chimiq. de France*, 1924 : Observat. et exp. sur dosage rapide acide phosph. par méthode Copaux.
45. DASTRE. — Paris, 1890 : Les anesthésiques.
46. DASTRE et MORAT. — *Thèse Dastre S. N.*, 1876 : Propriétés des lécithines.

47. DELEZENNE. — Hémolyse, lysocithine.
48. DENIGÈS. — *Soc. Pharm.*, Bordeaux, 1903 : Réactions de la cholestérine.
48. DENIGÈS. — *C. R. Soc. biol.*, p. 875, mai 1921 : Déterminat. quantitative des plus faibles quantités de phosphates dans les produits biologiq. par la méthode céruléo-molybdique.
49. DESGREZ. — Lécithine.
50. DIAKONOW.
51. DODGE. — *J. Mich. M. Soc. brand Rapids*, 1917 : Evolution de l'anesthésie.
52. DORMEYER. — *Arch. f. d. gesamm. physiol.*, 61, p. 341 et 65, p. 90.
53. DRECHSEL. — Hydrolyse des protéiques, 25.
54. DUBOIS (R.). — *Revue gén. Sciences*, n° 17, Paris, 1891 : Mécanisme action des anesthésiques.
55. DUCCESCHI. — *Archivio di Fisiol.*, t. XII, p. 147, 1915 : Cholestérine du sang dans l'intoxication par l'alcool.
55. DUCCESCHI. — *Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini*, t. XXVII, p. 118, 1919 : Cholestérine du sang dans intoxication par l'éther et le chloroforme.
56. ERNST. — *Med. Klin Berlin*, 1919 : Théorie de l'anesthésie.
57. FIESSINGER et CLOGUE. — *C. R.*, 1918 : Un nouveau ferment des leucocytes du sang et du pus : la lipoïdase.
58. FINKENER.
59. FLEURENT. — *Bull Soc. Chim.*, t. XXXIII, p. 101 : Minéralisation pour doser les lipoïdes phosphorés.
60. FLEXNER. — *Noguelsi Fallgirst*: Propriété de la lécithine d'activer les toxines et les venins.
61. FLUSIN. — Perméabilité des membranes.
62. FOURNEAU. — *Bull. Soc. Chimiq.*, 1914 : Lysocithines.

62. FOURNEAU. — *S. R. Soc. chim. biol.*, 1918 : Etude sur les membranes lipoides artificielles.
62. FOURNEAU. — *S. R. Soc. chim. biol.*, 1920 : Phosphatides.
63. FRANTZ. — Anesthésiques.
64. FRÉSENIUS. — *Traité chim. analyt. quantitative*: Dosage par pesées des lipoides phosphorés.
65. GERARD. — *Contribution à l'étude de la cholestérine animale et végétale*, Toulon, 1895 : Méthode pour isoler la cholestérine rapidement.
65. GERARD. — *Soc. biologie*, 1912 : Méthode colorimétrique pour doser la cholestérine.
66. GEUSLER.
67. GORLEY. — *J. P. C.*, t. CCXXI, p. 241, 1852 : Composition de la matière grasse du sang.
68. GREHANT et QUINQUAND. — *C. R.*, 1883 : Dosage du chloroforme dans le sang du chien anesthésié.
69. GRIGAUT. — *Soc. Biol.*, 1912 : Extraction directe de la cholestérine du sang.
69. GRIGAUT. — *Soc. Biol.*, juin-juillet, 1912 : Méthode pour séparer et doser la cholestérine.
69. GRIGAUT. — *Thèse*, Paris 1913 : Cycle de la cholestérimie.
70. GRIMBERT et LEVILLÉ. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, t. XV, p. 23, 1915 : Caractérisation des traces d'apomorphine.
71. GYRON. — *Blutchem. Zeitschr.*, 1921 : Influence des lecitines sur la vitesse de sédimentation des hématies lavées.
72. HALE. — *Arch. int. Med.*, Chicago, 1915 : Variations de la toxicité du chloroforme dans l'anesthésie.
73. HENSEN. — *Archiv. für experim. Path. und Pharmacologie*, n° 78, 1915 : Über den Phosphorgehalt tierischer Organe nach verschiedenartiger Fütterung.

74. HOBBS. — London, Baillière. *In dallet Cox.*, 1915 : Anesthésie des animaux et des oiseaux.
75. HÖBER.
76. HOPP-SEYLER. — *Virchow. Archiv.*, t. XII, p. 481, 1857 : Dosage des graisses du sérum de cheval.
76. HOPP-SEYLER. — *Méd. chem. Untersuchungen*, p. 133-150 et 169-208, 1866 : Existence de la cholestérine et du protagon dans les globules rouges.
76. HOPP-SEYLER. — *Med. Chem. Untersuchungen*, p. 10, 1866 : Etude du protagon et de la cholestérine des globules d'oies engraisées et du sang d'un leucémique.
76. HOPP-SEYLER. — *Ibid.*, 1866, p. 391-393 : Dosage des lécithines dans globules hérisson et couleuvre.
76. HOPP-SEYLER. — *Ibid.*, 1866, p. 551 : Variations des graisses dans le sang au cours de la chylurie.
76. HOPP-SEYLER. — *Traité d'analyse chimiq. appliq. à physiol. et pathol.*, 1877 : Modifications pour dosage graisses.
77. HORWITZ. — *Etude clinique de l'éthylène*. London, 1920.
78. HUGOUNENQ. — *Précis de chimie physiologique et pathologique*, 1925.
79. ISCOVESCO. — *Soc. Biologie*, 1912 : Méthode de dosage de cholestérine totale.
79. ISCOVESCO. — *Presse Médic.*, n° 61, p. 653, 2 août 1922 : Les lipoïdes.
80. IVERSEN. — *P. Biochem. Zeitschr.*, 1920 : Dosage de phosphore dans petites quantités de sang et plasma.
80. IVERSEN. — *P. Biochem. Zeitschr.*, 1921 : Partage des phosphates entre les corpuscules sanguines et le plasma *in vivo* et *in vitro*.
81. JACKSON. — *J. Lab. et Clin. M.*, Saint-Louis, 1915 : Action pharmacologiq. de l'oxyde nitreux.
82. JACOBY (M.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1919 : Action stimulante de lécithine sur formation des ferments.

83. JAVILLIER. — *Bullet. Soc. Chimiq.*, mai 1925.
84. JOLYET (E.) et BLANCHE. — *C. R. Soc. Biologie*, t. XXV, p. 223, 1873 : Anesthésie par N²O.
85. KUMAGAWA et SUTO. — *Bioch. Zeitschr.*, p. 212, 1908 : Méthode pour séparer et doser la cholestérine.
85. KUMAGAWA et SUTO. — *Bioch. Zeitschr.*, t. VIII, p. 213, 1908 : Appareil pour épuiser corps gras deshydratés.
85. KUMAGAWA et SUTO. — In *Handbuch d. biochemischen Arbeits methoden von Abderhaldem*, vol. 1: Extraction directe des corps gras.
85. KUMAGAWA et SUTO. — *Bioch. Zeitschr.*, 1908 : Méthode pondérale pour doser cholestérine.
86. KYES (P.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1908 : Formation des lécithines.
87. LAMBLING. — *Précis Biochimie*, Paris, Masson, 1922.
88. LAPICQUE. — *C. R. Soc. de Biolog.*, p. 92, 8 février 1919 : Origines françaises du procédé dit de Neumann. Incinération par acides sulfurique et azotique.
89. LAPWORTH. — *Journal de path. et bact.*, vol. 15, p. 254, 1910 : Méthode de deshydratat. pour les lipoides.
90. LARROCHE. — *Revue française endocrinologie*, tome I, n° 3, p. 185, 1923 : Capsules surrénales et cholestérine.
91. LAUDAT. — *Thèse*, Paris, 1913 : Etudes analytiques lipoïdes et mat. grasses du sérum sanguin.
92. LE BRETON. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, n° 3, 1921 : Sur la présence et le dosage dans le phosphore lipoïdique total ethero soluble de composés phosphorés autres que les phosphatides.
93. LEMELAND. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921 : Recherches chimiq. et physiol. sur mat. grasses et lipoides du sang et *Bull.* de février 1923.
94. LENOIR. — *Revue méd.*, Paris, 1914 : Contribution à étude des phénomènes physiol. et psych. observés pendant la narcose.

95. LEULIER (A.). — *Bull. Soc. Pharmacie de Lyon*, novembre 1922.
96. LEURET et RIOUX. — *Press. médic.*, 1924 : Anesthésie au chloral en présence de citrate de soude en solution par la voie intraveineuse.
97. LEVENE (P.-A.) et INGVALDSEN. — *Journ. of Biol. chem.*, 1920 : Dosage de l'aminoéthanol et de la Choline produits par hydrolise des phosphatides.
97. LEVENE (P.-A.) et INGVALDSEN. — *Journ. of Biol. chem.*, 1921 : Lipoides non saturés du foie.
98. LEVENE (P.-A.) et ROLF (Ida-P.). — *Journ. of Biol. chem.*, 1921 : Acides gras, lécithines du jaune d'œuf.
98. LEVENE P.-A. et I.-P. ROLF. — *Journ. of Biol. chem.*, 1921 : Lécithine du cerveau.
99. LEWKOWITSCH. — *Berich. der deutsch. Chem. gesellschaft*, 1892 : Dosage de la cholestérine.
100. LIEBERMANN. — *Szekely. Arch. f. d. Phys.*, t. LXXII, p. 360 : *Rostock*, 1889 : Réactions pour identifier cholestérine.
100. LIEBERMANN. — *Bericht. der deutsch. Chem. gessell.* Saponification directe des corps gras par les alcalis.
101. LIEBRIECH. — *Deutsch. Natv. Berich.*, p. 88, 1864 : Existence du protagon dans le cerveau.
102. LILLIE. — *Am. Year Book. Anesth.*, 1916 : Théorie physico-chimiq. de l'anesthésie.
103. LINDENMAYER. — *Journ. f. pratisch. Chem.*, 90, p. 323, 1863 : Propriétés de la lécithine.
104. LIROSSIER (G.). — 1920 : Les lipoïdes dans l'infection et l'immunité.
105. LORENZ et PLÜCKER.
106. LUCKARDT et CARTER. — *Journ. of Ann. Méd. Assoc.*, t. VIII, p. 765, 17 mars 1923 : Action de l'éthylène sur le rythme cardiaque et la press. sanguine.
107. LÜDECKE.

108. MAC CLEUDON. — *Ann. J. Surge. Q. suppl. Austh.*, 1921 : Effets des anesthésiq. sur les cellules.
109. MAC LEAN (H.). — *Zeit phys. Ch.*, 1910 : Recherches sur la lécithine du jaune d'œuf.
110. MARIE. — *Annales Institut Pasteur*, t. XXXVII, 1923 : Recherches sur la cholestérine.
110. MARIE. — *C. R. H. Soc. Biolog.*, p. 76, 1923 : Dosage cholestérine dans sérums thérapeut.
111. MARTIN (M.-C.). — *Paris-Lyon*, 1883 : Anesthésie avec N²O avec ou sans tension.
112. MAURIAC et DEFAYE. — *Soc. biolog.*, 1912 : Critiq. du dosage colorimétriq. de cholestérine.
113. MAURIAC et STRYMBAU. — *C. R. H. Société de Biologie*, t. LXXXI, p. 134, 24 janvier 1914 : Cholestérine au cours de la grossesse.
114. MAYER (A.), MULLON et SCHAEFFER. — *Soc. Biologie*, 24 juil-1912 : Contribution à la microchimie des surrénales. pour isoler rapidement la cholestérine.
115. MAYER et SCHAEFFER. — *Soc. biol.*, 2 mars 1912 : Méthode pour isoler rapidement la cholestérine.
115. MAYER et SCHAEFFER. — *Soc. Biol.*, 1913 : Liquides prétendus fixateurs de lipoides.
115. MAYER et SCHAEFFER. — Juillet 1913 : Teneur en P. lipoïdique valeur rapportée au p. d'org. sec.
115. MAYER et SCHAEFFER. — *C. R. A. S.*, 2 février 1914 : Teneur tissus en lipoides et activité physiol. des cellules, cas régulation thermique.
115. MAYER et SCHAEFFER. — Février 1914 : Composit. tissus en acides gras non volatils et en cholestérine, existence constante lipocytiq.
115. MAYER et SCHAEFFER. — *C. R. A. S.*, juillet 1914 : Teneur tissus en P. lipoïdique. Dosages.
116. MELTZER (S.) et AUER (J.). — *Arm. Journ. of. Phys.*, 1905-1906 : Pouvoir hypnotique du chlorure de magnés.

117. MEYER (Hans). — *Archives für experimentale, Pathologie und Pharmacologie*, p. 109-118, 1899 : Zur Théorie der Alkohol narkose. Erste Mittheilung welsche eigenschafft der anästhesica medingt ihre narkotische wirkung.
118. MEYER (K.) et HOPFF. — *Zeit. physiol. Ch.*, t. CXXVI, p. 281-298, 1923 : Théorie narcose par inhalation anesthésique.
118. MEYER (K.) et HOPF. — *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, t. CXXVI, p. 281, 1922 : Concentrations actives du propylène et de l'éthylène.
119. MISSON (C.). — *Bull. Soc. Chimiq. de Belgique*, 1907 : Dosage colorimétrique du P. dans les fontes Bessmer et Thomas.
120. MOORE. — Sels biliaires et acides gras.
121. MOREAU. — *Thèse Fac. Méd.*, Lyon, 1901 : Minéralisation avant dosage des lipoides phosphorés.
122. MOREL (H.). — *Précis de technique chimique*. Collection Testut.
123. MORRIS. — *Lancet London*, 1921 : Anesthésie par l'oxyde nitreux et l'oxygène sous pression.
124. MULON et PORAK. — *C. R. H. Soc. biologie*, t. LXXVI, p. 273, 4 juillet 1914 : Rôle de la corticale surrénale dans l'immunité.
124. MULON et PORAK. — *C. R. H. Soc. biol.*, t. LXXVII, p. 406, 25 juillet 1914 : Sécrétion de cholestérine dans le sang par cellules du cortex surrénal.
125. NERKING. — *Munch. med. Wochenschr.*, 1909 : Lipoides agissant comme antitoxiques.
126. NEUBERG. — *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, t. XLVII, p. 335, 1906 : Réactions de la cholestérine.
127. NEUMANN. — *Arch. f. physiol.*, p. 208, 1907 : Minéralisation avant le dosage des lipoides phosphorés.

127. NEUMANN. — *Arch. f. physiol.*, p. 208, 1907 : Dosage du P. des lipoides phosphorés par méthode volumétrique.
128. NICLOUX. — Paris, 1908 : Anesthésiques généraux.
129. OBERMULLER. — *Zeitsch. f. physio. Chem.*, 16, p. 143 : Méthode de dosage colorimétriq. cholestérine.
130. OLIVA. — *München.*, 1914, R. Oldembourg, p. 167-169, 1914 : Variations du contenu en adrénalines des surrénales après anesthésie.
131. OLIVER (Th.) et CARRETT (F.-C.). — *The Lancet*, t. II, p. 625-627, 1893 : An analysis of the gases of the blood during chloroform ether by chloral of méthylène an autrans oxide anesthesid.
132. OVERTON E. — *Studien über die Narkose* : 1 vol. 195 pages, Iéna, 1901.
133. PAPIN et AMBARD. — *Presse médicale*, page 133, 13 février 1924.
134. PEMBREY. — *Proc. Roy. Soc. méd. Lond.*, 1915 : Observat. sur influence anesthésiq. sur la température du corps.
135. PFLÜGER. — *Arch. f. gesamm. physio.*, 51, p. 277 : Dosage lipoides phosphorés après digestion pepsique.
136. POHL (J.). — *Archives für experimentäle, Pathologie und Pharmacologie*, t. XXVIII, p. 138-255, 1890 : Uebervanfnalune und vertheilung des chloroforms im thierischen organismus.
137. POLICARD. — *Bull. et Mémoires de la Société Médicale des Hôpit. de Lyon*, t. XII, p. 402, 1914 : Quelques données sur la cholestérine et sa mise en évidence dans les cellules et tissus.
138. PORGES (O.) et NEUBAUER (E.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1907 : Recherches physico-chimiques sur la cholestérine et la lécithine.

139. POSNER et GIES. — *Journal of biologic. Chemistry*, I, 59 : Analyse du protagon.
140. POSTERNAK. — *Bulletin Société chimique*, 1919-1921 : Méthode micro-chimique de dosage du phosphore.
141. POUGET et CHOUCHEK. — *Bull. Soc. chimique*, série 4, 1904, v. 104.
142. QUAIN. — *Ir West Surg. Ass. Minneapolis*, p. 227-238, 1919 : Mélange chlorure d'éthyle, chloroforme, éther pour anesth. générale.
143. REGAUD et POLICARD. — *C. P. S.*, 1914 : Modifications bordure en brosse cellules rénales.
144. REGNAULT et VILLEJEAN. — *J. de Ph. et Ch.*, 1884 (5), 9, 386.
144. REGNAULT et VILLEJEAN. — *J. de Ph. et Ch.*, 1886 (5), 11, 594.
145. RÉMOND (A.), COLOMBIÈS et BERNARDBEIG. — *C. R. H. Soc. de Biologie*, tome XC, p. 1209, 18 avril 1924 : Recherches sur le métabolisme de la cholestérine.
145. RÉMOND (A.), COLOMBIÈS et TRÉGANT. — *C. R. H. Soc. de Biologie*, tome XC, p. 1385, 24 mai 1924 : Recherches sur le métabolisme de la cholestérine.
145. RÉMOND (A.), COLOMBIÈS et BERNARDBEIG. — *C. R. H. Soc. de Biologie*, tome XC, p. 1445, 31 mai 1924 : Recherches sur le métabolisme de la cholestérine.
146. RICHET (Ch.). — *C. R. Académie des Sciences*, tome CLXXVI, 16 avril 1923 : La rate, organe utile, non nécessaire.
147. ROAF. —
148. ROOD. — *Clin. J. Lond.*, 1922 : Anesthésiques.
149. RITTER. — *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 34, p. 430 : Méthode pour séparer et doser la cholestérine.
150. ROLLET. — Lécithine.

151. ROSS. — *J. Biol. Chem. Bal.*, 1916 : Influence des anesthésiques sur les acides aminés du sérum sanguin.
152. ROTHEA. — *Archives Médecine et Pharmacie militaires*, avril 1921 : Les hypnotiques chimiques.
153. ROUZAUD (J.-S.) et MANCEAU (P.-A.). — *Archives Médecine et Pharmacie militaires*, tome LXXIX, 24 octobre 1923 : Application de la chimie biologique à la station de Vichy.
154. SALKOWSKI. — *Pfug. Arch.*, 6, 207, 1872 : Réaction pour identifier la cholestérine.
155. SICHKORSKI. — *Russki Vrach Petrograd*, 1910, 9, 1447. *Sage The Lancet*, 1912, t. CLXXXII, p. 1258.
156. SCHUMOFF (C.). — *Simanowski Nieber Zeit phys. ch.*, 1906 : Manière dont se comporte la lécithine vis-à-vis des diastases lipolytiques.
157. SLOWTZOFF. — *B. Beitr. chem. Physiol. u. Sattro.*, 1906 : Influence de la lécithine dans les échanges nutritifs.
158. STOKLASA. — *Zeit f. physiol. chem.*, p. 343, 1897 : Minéralisation avant dosage dans lipoïdes phosphorés.
159. STRECKER. —
160. TAKAKI. — *Beitr. z. chem. physiol. und pathol.*, 1908 : Propriété fixatrice des lipoïdes.
161. TERROINE (E.). — *Acad. Sciences*, 1914 : Constance concentration des organismes totaux en acides gras et cholestérine.
162. THIERFELDER. — *Zeit. physiologie Chem.*, t. III, p. 260.
163. THIEULIN. — *Société biologie*, 1920 : Membrane contenant à une dose suffisante un lipoïde (cholestérine ou lécithin.) ne laisse pas diffuser Cl Na.
164. THUDICUM. — *Konstitution des Gelium des Menschen*, 1901 : Tübingen.
164. THUDICUM. — *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1907 : Classification des phosphatides.

- 164 bis. TIFFENEAU. — *Bull. Gén. de Thérapeutique*, t. CLXXV, n° 6, juin-juillet 1924.
165. TISSOT (J.). — *Journal Physiologie et Pathol. générale*, t. VIII, p. 417-18, 1906 : Etude conditions qui régissent pénétration des anesthésiq.
166. TRAUBE. — *Arch. f. d. ger. Physiol.*, Bonn, 1915: Théorie de la narcose.
167. TREADWELL. — *Précis d'analyse quantitative* : Dosage du phosphore.
168. TSCHUGAJEW. — *Ref. Z. f. ang. ch.*, p. 618, 1900: Réaction pour identifier la cholestérine.
169. VILLIERS et BORG. — *C. R. A. S.*, t. CXVI, p. 990, 1893 : Dosage par pesée du phosphore des lécithines.
170. VIRCHOW. — *Chem. Zeit.*, 35, p. 913, 1911 : Minéralisation avant dosage lipoides phosphorés.
171. WEILL (J.). — *C. R. Académ. Sciences*, t. CLVIII, p. 642, 2 mars 1914 : Sur la teneur en acides gras et en cholestérine des tissus d'animaux à sang froid.
172. WESTON. — *Journ. of. biolog. Chemistry*, t. XXVIII, p. 383, 1916 : Colorimetric methods for determining serum cholestrol.
173. WIDAL, WEIL et LAUDAT. — *Chem. médica.*, 1912 : Equilibre lipoïdique au cours de la maladie de Bright.
173. WIDAL, WEIL et LAUDAT. — *Chem. médica.*, 1912 : Lipoi-des contenus dans le sérum sanguin.
174. WIELAND. — *Arch. f. exp. Path. und Pharm.*, t. LXXXXII: Propriétés anesthésiques de l'éthylène.
175. WIELAND et GAUSS. — *Klinische Wochenschr.*, t. II, p. 113, et 158 : Propriétés anesthésiques de l'éthylène.
176. WILLSTAETTER. — Hémoporphyrine, étioporphyrine, chlorophyll.
177. WINDAUS. — *Chem. Zeit.*, t. XXX, p. 1.011, 1906 : Réaction de Windaus sur la cholestérine.

177. WINDAUS. — *Bericht. a dent. chem. gesellschaft*, t. XLII, p. 238, 1909 : Elimination cholestérine dans dosage graisses et acides gras.
177. WINDAUS. — *Zeitsch. f. physiol. chem.*, t. LXV, p. 110, 1910 : Action lécithine en présence digitonine.
178. Woy. — Cité par Treadwell: Dosage du phosphore.
179. YAMAKOSHI (J.). — *Bull. Nav. Med. Ass. Japan*, Tokio, n° 22, p. 7, 1919: The quality of cholesterin in the blood.
-

